



Universidad Nacional Mayor de San Marcos

Universidad del Perú. Decana de América

Dirección General de Estudios de Posgrado

Facultad de Medicina Veterinaria

Unidad de Posgrado

**Respuesta inmune celular en la mucosa intestinal de
crías de alpacas (*Vicugna pacos*) clínicamente sanas**

TESIS

Para optar el Grado Académico de Magíster en Ciencias
Veterinarias con mención en Salud Animal

AUTOR

Raquel Andrea WATANABE WATANABE

ASESOR

Alberto Gustavo MANCHEGO SAYÁN

Lima, Perú

2016



Reconocimiento - No Comercial - Compartir Igual - Sin restricciones adicionales

<https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/>

Usted puede distribuir, remezclar, retocar, y crear a partir del documento original de modo no comercial, siempre y cuando se dé crédito al autor del documento y se licencien las nuevas creaciones bajo las mismas condiciones. No se permite aplicar términos legales o medidas tecnológicas que restrinjan legalmente a otros a hacer cualquier cosa que permita esta licencia.

Referencia bibliográfica

Watanabe R. Respuesta inmune celular en la mucosa intestinal de crías de alpacas (*Vicugna pacos*) clínicamente sanas [Tesis de maestría]. Lima: Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Facultad de Medicina Veterinaria, Unidad de Posgrado; 2016.



UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS
Universidad del Perú, DECANA DE AMERICA
Facultad de Medicina Veterinaria
UNIDAD DE POSGRADO



ACTA DE SUSTENTACIÓN DE TESIS PARA OPTAR EL GRADO ACADÉMICO DE
MAGÍSTER EN CIENCIAS VETERINARIAS MENCIÓN SALUD ANIMAL

En el Auditorio de la Facultad de Medicina Veterinaria de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos, siendo las 10:30 horas del día viernes 27 de mayo del 2016, el Jurado Examinador de Tesis de Grado de Magíster, presidido por el Dr. Raúl Héctor Rosadio Alcántara y constituido por los siguientes miembros: Mg. Boris Antonio Lira Mejía, Mg. Alberto Manchego Sayán (Asesor), Mg. José Espinoza Babilón y Mg. Olga Mirtha Li Elías, se dio inicio a la sustentación oral y pública de la Tesis intitulada:

" RESPUESTA INMUNE CELULAR EN LA MUCOSA INTESTINAL DE CRÍAS DE ALPACAS (*Vicugna Pacos*) CLÍNICAMENTE SANAS", presentado por la M.V.:

RAQUEL ANDREA WATANABE WATANABE

Quien sustentó la tesis para obtener el Grado Académico de Magíster en Ciencias Veterinarias mención Salud Animal y absolvió satisfactoriamente las preguntas y objeciones formuladas por el Jurado y practicada la votación obtuvo la calificación: MUY BUENO 17

A continuación, el Presidente del Jurado recomendó que la Facultad de Medicina Veterinaria proponga el otorgamiento del Grado Académico de Magíster en Ciencias Veterinarias mención Salud Animal, a la M.V. Srta. **RAQUEL ANDREA WATANABE WATANABE**.

Siendo las 12:00 horas del día viernes 27 de mayo del 2016, se dio por concluido el acto académico, suscribiéndose la presente Acta.

Dr. Raúl Héctor Rosadio Alcántara (P.P.T.C)
Presidente

Mg. Olga Mirtha Li Elías (P.P.D.E.)
Miembro

Mg. Alberto Manchego Sayán (P.P.D.E.)
(Asesor)

Mg. Boris Antonio Lira Mejía (As T.C)
Miembro

Mg. José Espinoza Babilón (P.P.T.C)
Miembro

Dr. César Miguel Gavidia Chucán (P.A.D.E.)
Director de la Unidad de Posgrado
Facultad de Medicina Veterinaria
UNMSM

DEDICATORIA

Dedicado a mis padres Romel y Carmen por su amor, confianza, ejemplo, enseñanzas, virtudes, valores, paciencia y apoyo infinito e incondicional.

A mi hermano Diego, quien siempre será mi “hermanito menor”.

A Álvaro, quien siempre será como mi hermano mayor en mi corazón.

A mis mejores amigos Carlos Enríquez, Rocío Rímac, Melissa Dursun, Armando González, Vladimir Schander, Sara Pizarro, José Angulo, Luis Jara, Mario Diehl, Loïc Temmerman y Verónica López por su inmenso cariño, respeto y, sobre todo, por su amistad incondicional y verdadera.

A mis queridísimos alumnos Andrea Tavera, Steffi Roller, Irán Zavaleta, Hiroshi Farro y Erao Arias, por su inmenso aprecio y nobleza, destacadísimos estudiantes y futuros colegas médicos veterinarios.

Al DVM. MSc. Raúl Guerrero, por sus consejos y enseñanzas, por su apreciada amistad, por ser un ejemplo de profesional exitoso con un gran corazón y por demostrar en actos que la grandeza académica, la riqueza del corazón, la bondad y la humildad son la mejor combinación de profesionales líderes y exitosos como él.

A Diego, por ser quien es y por emprender juntos una vida por delante.

AGRADECIMIENTOS

A Dios Todopoderoso por siempre vivir en mí, por el milagro del 17 de agosto del 2012, y todos los acontecimientos trascendentales en mi vida del 14 de marzo del 2012, 13 de junio del 2013, 16 de febrero del 2014, 14 de junio del 2015, 27 de diciembre del 2015 y 20 de julio del 2016, por bendecirme y guiar mi camino. Para Él todo mi amor incondicional y leal, Señor mío.

A la MSc. Blga. Jimena Collantes, al MSc. TM. Jason Rosado y al MSc. TM. Jorge Inolopú, mis queridos amigos y maestros del Instituto de Medicina Tropical Alexander von Humboldt de la Universidad Peruana Cayetano Heredia, por sus valiosos consejos y sugerencias, paciencia, apoyo desinteresado y guía desde los conocimientos básicos hasta los más complejos para la elaboración de esta tesis.

Al MV. Carlos Enríquez, la MV. Rocío Rímac, la MV. Sara Pizarro, la MV. Verónica López, al Mg. MV. José Angulo y al MSc. MV. Luis Jara, por representar el significado de amistad incondicional y profesionalismo, perseverancia, optimismo, dedicación y seriedad académica, jóvenes con actitud dotados de un infinito potencial académico traducido en un futuro por delante brillante y deparado de muchos éxitos.

A la MSc. Deniz Yildirim, coordinadora del 32nd World Veterinary Congress (Estambul, Turquía) por brindarme las facilidades en el autofinanciamiento de mi participación como ponente en tan magno evento a fin de representar orgullosamente a mi *alma mater*, la Facultad de Medicina Veterinaria de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos. Al Presidente de la Asociación de Médicos Veterinarios de Turquía, el Dr. Mehmet Maden, moderador de mi ponencia, por sus valiosas palabras de reconocimiento al concluir mi presentación.

A la Dra. Mg. MV. Shirley Evangelista y al Dr. Mg. MV. Alexei Santiani por representar en mí un ejemplo de calidad de profesionales investigadores destacados que brillan con luz propia, por tener un corazón lleno de bondad y ser padres ejemplares, no sólo con sus hijos propios, sino también, con quienes hemos sido sus alumnos.

Al DVM. MSc. MV. Raúl Rosadio Alcántara y al Dr. Mg. Blgo. Lenin Maturrano Hernández por sus aportes cognitivos invaluable, por ser mis mentores y maestros, por mostrarme el significado de hacer investigación seria basada en la verdad y evidencias, y por ser pilares fundamentales de importancia internacional en investigación en mi *alma mater*, la Facultad de Medicina Veterinaria de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos.

Al VMD, MS, DACVIM Christopher Cebra por inspirarme en desarrollar investigación en alpacas y por enseñarme la pasión que sólo investigadores serios y trascendentales irradian.

Al PhD. Mg. Blgo. José Espinoza Babilón, Director de la Unidad de Posgrado de la Universidad Peruana Cayetano Heredia, por sus aportes durante la sustentación de la presente tesis en calidad de investigador experimentado con una alta trayectoria en el campo de la Inmunología.

A la Dra. Mg. Blga. Sonia Calle Espinoza por su confianza y cariño a través de los años, así como a la Mg. MV. Eliana Icochea D'Arrigo, ambas profesionales destacadas que dejan en alto el nombre de la Facultad de Medicina Veterinaria de la UNMSM.

Al MV. Guillermo Salvatierra y al MV. André Sedano por los gratos momentos compartidos en armonía durante el desarrollo de las clases prácticas del curso de Microbiología Veterinaria, jóvenes profesionales responsables con un futuro prometedor en la docencia universitaria.

Al Mg. MV. Alberto Manchego por la oportunidad de desarrollar la presente tesis en el Laboratorio de Microbiología y Parasitología Veterinaria, sección Inmunología, a través del Proyecto FINCyT contrato N° 180 PIBAB-2013, a la MV. Gina Castro por su apoyo durante el desarrollo de la parte experimental y logística de este proyecto de dos años y medio de duración, y al Bach. MV. Joan Reyes por asistirme durante el dictado de las clases prácticas del curso de Inmunología Veterinaria 2015 en nuestra *alma mater*.

ÍNDICE DEL CONTENIDO

	Pág.
RESUMEN	viii
ABSTRACT	ix
LISTA DE CUADROS	x
LISTA DE FIGURAS	xi
APÉNDICE	xii
I. INTRODUCCIÓN	1
II. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA	4
2.1. La alpaca (<i>Vicugna pacos</i>)	4
2.2. Avances en el estudio de la inmunología de crías de alpaca	5
2.3. Avances en el estudio de enteropatías en crías de alpaca	7
2.4. Inmunidad en la mucosa intestinal	11
2.4.1. Sitios inductores y efectores	13
2.4.1.1. Anatomía y composición celular del GALT	14
2.4.2. Respuesta inmunitaria en la mucosa intestinal	19
2.4.2.1. Captación de antígenos lumbinales	19
2.4.2.2. Inducción de la respuesta inmunitaria	20
2.5. Inmunidad adquirida: activación y diferenciación linfocitaria	22
III. MATERIALES Y MÉTODOS	31
3.1. Lugar de estudio	31
3.2. Animales y tamaño muestral	31
3.3. Obtención y procesamiento de las muestras	32
3.4. Extracción del ARN total	33
3.4.1. Etapa de separación con Trizol® Reagent	33
3.4.2. Captura del ARN	34
3.4.3. Tratamiento con DNAsa I	34
3.4.4. Lavado y recuperación del ARN	34
3.5. Cuantificación del ARN	35
3.6. Electroforesis de ARN en gel desnaturizante	36
3.6.1. Preparación del gel	36

3.6.2. Preparación del buffer de carga	36
3.7. Síntesis de ADN complementario (ADNc) o transcripción inversa	37
3.8. PCR tiempo real para los genes GAPDH, IFN- γ , TNF- α , IL-2, IL-12, T-bet, STAT-1 y STAT-4	39
3.9. Cuantificación relativa	42
3.10. Análisis de la información	43
IV. RESULTADOS	44
4.1. Expresión del gen endógeno GAPDH	44
4.1.1. PCR con transcripción inversa en tiempo real	44
4.2. Expresión del factor transcripcional STAT-1	44
4.2.1. PCR con transcripción inversa en tiempo real	44
4.2.2. Cuantificación relativa y análisis estadístico	45
4.3. Expresión del factor transcripcional T-bet	45
4.3.1. PCR con transcripción inversa en tiempo real	45
4.3.2. Cuantificación relativa y análisis estadístico	45
4.4. Expresión de interferón gamma (IFN- γ)	46
4.4.1. PCR con transcripción inversa en tiempo real	46
4.4.2. Cuantificación relativa y análisis estadístico	46
4.5. Expresión del factor transcripcional STAT-4	46
4.5.1. PCR con transcripción inversa en tiempo real	46
4.5.2. Cuantificación relativa y análisis estadístico	47
4.6. Expresión de interleucina 12 (IL-12)	47
4.6.1. PCR con transcripción inversa en tiempo real	47
4.6.2. Cuantificación relativa y análisis estadístico	47
4.7. Expresión de interleucina 2 (IL-2)	48
4.7.1. PCR con transcripción inversa en tiempo real	48
4.7.2. Cuantificación relativa y análisis estadístico	48
4.8. Expresión del factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α)	48
4.8.1. PCR con transcripción inversa en tiempo real	48
4.8.2. Cuantificación relativa y análisis estadístico	49
V. DISCUSIÓN	53
VI. CONCLUSIONES	66
VII. SUGERENCIAS	67

VIII. LITERATURA CITADA	68
IX. APÉNDICE	80

RESUMEN

El objetivo del estudio fue el evaluar cuantitativamente la expresión de los ARN mensajeros (ARNm) de los factores de transcripción T-bet, STAT-1 y STAT-4 y de las citoquinas interleucina (IL) 12, IL-2, interferón gamma (IFN- γ) y factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α) involucrados en la activación y desarrollo de los linfocitos Th1 de la mucosa intestinal de crías de alpacas (*Vicugna pacos*) de tres grupos de 1-8, 10-21 y 22-47 días de edad, alimentadas en rebaños con pasto natural en la sierra sur del Perú. Se obtuvo muestras de una longitud de 2 cm de la porción media del yeyuno de crías de alpacas clínicamente sanas de la Estación IVITA Maranganí (Cusco, Perú), las que fueron almacenadas a -196°C y procesadas en el Laboratorio de Inmunología de la Facultad de Medicina Veterinaria de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos (Lima, Perú). Se extrajo los ARN totales y se desarrolló la PCR tiempo real con transcripción inversa (RT-PCR). Se midió los valores de Ct (ciclo umbral, *cycle threshold*) y Tm (temperatura de disociación, temperatura de *melting*) de los productos del RT-PCR y se empleó la técnica de cuantificación relativa $2^{-\Delta\Delta Ct}$ a fin de evaluar la expresión de los ARNm de los factores mencionados respecto al control calibrador (fetos) en los tres grupos etáreos, empleándose como gen constitutivo de referencia a GAPDH. Las expresiones de T-bet, STAT-1 y STAT-4 mostraron una tendencia positiva proporcional a la edad, siendo de 35, 6 y 3 veces lo expresado por el calibrador el grupo de 22-47 días de edad, respectivamente. Asimismo, las cinéticas de expresión en IL-2, IFN- γ y TNF- α mostraron una tendencia positiva proporcional a la edad siendo de 26, más de cien y 5 veces lo expresado por el calibrador en el grupo de animales de 22-47 días de edad, respectivamente ($p < 0.05$). La cinética de expresión de IL-12 alcanzó su máxima expresión en el grupo de 10-21 días de edad mostrando una expresión inferior en comparación con la del grupo calibrador ($p > 0.05$). En conclusión, la expresión de T-bet y STAT-1, factores transcripcionales activados por interferón gamma, se incrementó con la edad, así como también de las citoquinas involucradas en la respuesta inmune Th1, a diferencia de la expresión de STAT-4 e IL-12 que estadísticamente no difiere significativamente en los tres grupos etáreos.

Key words: respuesta inmune celular, mucosa intestinal, camélidos sudamericanos, factores de transcripción

ABSTRACT

The aim of the study was to quantitatively estimate the expression of the RNA messengers (mRNA) of the transcription factors T-bet, STAT-1 and STAT-4 and the cytokines interleukin (IL-) 12, IL-2, gamma interferon (IFN- γ) and alpha tumor necrosis factor (TNF- α) involved in the activation and development of intestinal mucosa Th1 lymphocytes in clinically healthy baby alpacas (*Vicugna pacos*) from three age-groups of 1-8, 10-21 and 22-47 days-old, which were bred in flocks with natural grazing in the Southern Peruvian highlands. Two centimeters-intestinal samples were obtained from the jejunum middle portion of healthy alpaca crias at the IVITA Marangani Station (Cusco, Peru), which were stored at -196°C and processed in the Laboratory of Veterinary Microbiology and Parasitology, Immunology section, of the School of Veterinary Medicine from San Marcos University (Lima, Peru). Total RNA were extracted and the reverse transcription-PCR real time (RT-PCR) was performed. Cycle threshold (Ct) values and melting temperature (Tm) of the RT-PCR products were measured. Subsequently, the quantitative mRNA expression of the transcription factors and cytokine were estimated by comparing to the expression profiles in the calibrator control (fetus) by the $2^{-\Delta\Delta C_t}$ method using GAPDH as a housekeeping gene and endogenous control. T-bet, STAT-1 and STAT-4 expression were shown increased with age, exceeding in thirty five, six and three-fold the calibrator control expression in the 22-47 days-old group, respectively. Likewise, IL-2, IFN- γ and TNF- α kinetic expression patterns were shown positive and directly proportional to the age, with twenty six, more than a hundred and five-fold the calibrator control expression in the 22-47 days-old group, respectively ($p < 0.05$). IL-12 kinetic expression pattern reached it maximum in the 10-21 days-old group showing a low expression in comparison to the calibrator's one ($p > 0.05$). In conclusion, the expressions of both transcriptional factors activated by gamma interferon T-bet ($p < 0.05$) and STAT-1 ($p > 0.05$) increase with age, as well as the three cytokines involved in the Th1 immune response. STAT-4 and IL-12 expressions were not statistically different in the three age groups.

Key words: cellular immune response, intestinal mucosa, South-American camelids, transcription factors

LISTA DE CUADROS

	Pág.
Cuadro 1. Clasificación taxonómica de la alpaca	5
Cuadro 2. Master Mix para la síntesis de 20 µl de ADN complementario (ADNc) a partir de ARN total.	38
Cuadro 3. Oligonucleótidos empleados para la PCR tiempo real cuantitativa de GAPDH y las citoquinas y factores transcripcionales involucrados en el perfil Th1 en alpacas.	39
Cuadro 4. Master Mix empleado en las PCR tiempo real de los genes en estudio.	41
Cuadro 5. Protocolo de las PCRs en tiempo real en el termociclador Applied Biosystems® 7500 Real-Time PCR System (Life Technologies, USA).	42
Cuadro 6. Temperaturas de disociación (T _m) de los productos de PCR de los genes en estudio.	50

LISTA DE FIGURAS

	Pág.
Figura 1. Principales diferencias entre linfocitos Th1 y Th2.	23
Figura 2. Activación del linfocito Th1.	25
Figura 3. Desarrollo de los linfocitos Th1.	26
Figura 4. La polarización de las respuestas Th1 y Th2 por células T CD4 ⁺ y el papel de las citoquinas antiinflamatorias en la diferenciación de las células T.	27
Figura 5. Expresión relativa de citoquinas y factores transcripcionales involucrados en la activación y diferenciación del linfocito Th1.	49
Figura 6. Expresión relativa de T-bet, STAT-1 e IFN- γ .	52
Figura 7. Expresión relativa de STAT-4, IL-12 e IL-2.	52

APÉNDICE

	Pág.
Cuadro A.1	81
Cuadro A.2	82
Cuadro A.3	83
Cuadro A.4	85
Figura A.1	86
Figura A.2	87
Figura A.3	88
Figura A.4	89
Figura A.5	90
Figura A.6	91
Figura A.7	92
Figura A.8	93
Figura A.9	94
Figura A.10	95
Figura A.11	96
Figura A.12	98
Figura A.13	99
Figura A.14	100
Figura A.15	101

I. INTRODUCCIÓN

Los camélidos sudamericanos (CSA) constituyen un recurso genético de gran importancia social, económica, cultural y científica para el Perú y algunos países de la Región Andina. La crianza de los mismos es una actividad única e ideal para las condiciones de producción en las zonas altoandinas del Perú, siendo la crianza de alpacas en estos pisos ecológicos la de mayor importancia por su aporte en la producción de fibra, carne y piel. Sin embargo, el verdadero potencial productivo de esta especie no se expresa a cabalidad, pues se encuentra limitado por factores nutricionales, bajas tasas de natalidad y enfermedades que se traducen en altos índices de mortalidad neonatal (Ameghino y DeMartini, 1991).

Las citoquinas desempeñan un papel importante en la defensa del organismo de humanos y animales frente a infecciones o lesiones al dirigir la respuesta inmune. El desarrollo de las enfermedades puede ser afectado o condicionado por las respuestas de estas citoquinas. Por tanto, el papel principal de las mismas en la mediación de la respuesta inmune ha sido ampliamente investigado con énfasis en el patrón de respuesta de las subpoblaciones de linfocitos T CD4⁺.

En la actualidad, una de las herramientas moleculares básicas más utilizadas es la Reacción en cadena de la polimerasa (PCR) con su variante de Transcripción inversa (RT, *reverse transcription*) en tiempo real (RT-qPCR), la que ha venido empleándose en diversos estudios sobre expresión relativa de algunas citoquinas y factores de transcripción en varias especies animales como el cerdo (Zanotti *et al.*, 2015), las aves (Hausman *et al.*, 2014), el bovino (Prohl *et al.*, 2015) y el equino (Wagner *et al.*, 2010) a fin de elucidar el tipo y la cinética de la respuesta inmune en condiciones específicas

que permitan generar alternativas preventivas o terapéuticas. No obstante, son aún escasos los estudios realizados en camélidos sudamericanos en los que se ha extrapolado, basado en las secuencias conservadas y homólogas con otras especies, el diseño de los oligonucleótidos empleados.

Estudios en camélidos del Viejo Mundo (*Camelus dromedarius* y *Camelus bactrianus*) y llamas (*Lama glama*), ejemplar del Nuevo Mundo, han elucidado la dinámica de expresión de algunos perfiles de citoquinas involucradas en las respuestas inmunes celulares y humorales (Odbileg *et al.*, 2005a, 2005b, Odbileg *et al.*, 2006), para luego ser evaluadas en condiciones *in vivo* frente a antígenos de *Brucella abortus* (Odbileg *et al.*, 2008). Tomando como referencia los oligonucleótidos empleados en estos estudios, el Laboratorio de Microbiología y Parasitología Veterinaria, sección Inmunología, de la Facultad de Medicina Veterinaria de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos, ha brindado alcances respecto a la cinética de la expresión *in vitro* de algunas citoquinas de alpacas (*Vicugna pacos*), aquellas más representativas de la respuesta inmune innata (IL-1a, IL-1b, IL-6, TNF- α) (Bardález *et al.*, 2013; Tambillo *et al.*, 2013; Hinostroza *et al.*, 2015) y adaptativa (IL-2, IFN- γ , IL-4, IL-10) (Chiok, 2012; More, 2013; Watanabe *et al.*, 2014; Watanabe, 2015), así como la presencia de péptidos antimicrobianos como defensinas (More *et al.*, 2011; Siuce *et al.*, 2015) e inmunoglobulina A (Dionisio *et al.*, 2014).

El propósito de la ejecución de la presente tesis consistió en determinar un perfil de la activación y diferenciación del linfocito Th1 en mucosa intestinal de crías de alpacas aparentemente sanas, como parte del Proyecto N°180-FINCyT-IB-2013 financiado por el Programa Nacional de Innovación para la Competitividad y Productividad (Innovate Perú), a fin de complementar los estudios transcriptómicos previamente realizados en crías de alpacas por el Laboratorio de Microbiología y Parasitología Veterinaria, sección de Inmunología. Si bien es cierto desde el 2010 se han brindado alcances sobre expresión génica de citoquinas involucradas en la respuesta inmune innata y adquirida en mucosa intestinal, es con este último proyecto que se han evaluado perfiles celulares completos incluyendo sus factores transcripcionales.

El estudio de la inmunología de la alpaca (*Vicugna pacos*) se encuentra en una fase incipiente, por tanto, aún queda por elucidar la cinética de las expresiones de citoquinas

in vivo y contrastarlas a nivel proteómico, a fin de corroborar los hallazgos obtenidos por transcriptómica. No obstante, el presente trabajo de investigación respecto a la activación y diferenciación del subtipo 1 de los linfocitos T de ayuda o colaboradores (Th1) en alpacas clínicamente sanas, brinda un panorama respecto a la cinética de expresión de las citoquinas y factores transcripcionales involucrados, aportando un alcance sustancial en el entendimiento de la respuesta inmune celular en esta especie animal.

II. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

2.1. La alpaca (*Vicugna pacos*)

Las relaciones entre la alpaca y los demás camélidos sudamericanos han sido controvertidas durante muchos años. En los siglos XVIII y XIX, cuando recibieron nombres científicos, se creía que la alpaca era descendiente de la llama (*Lama glama*) y por ello fue denominada *Lama pacos*, ignorándose sus similitudes con la vicuña tanto en tamaño, como en la lana y la dentición. Su clasificación se complicó tras comprobarse que las cuatro especies de camélidos sudamericanos pueden cruzarse entre sí y dar descendencia fértil. Finalmente, mediante el uso de técnicas moleculares, Kadwell *et al.* (2001) demostraron que la alpaca y la vicuña se encuentran estrechamente relacionadas y que el nombre científico correcto es *Vicugna pacos*. Debido a que se detectó un porcentaje de ADN de llama en el de la alpaca, se concluyó que la alpaca es técnicamente un taxón híbrido intergenérico. De esta manera, rectificaron la taxonomía de los camélidos sudamericanos a dos géneros *Lama* y *Vicugna*, cada uno con un animal silvestre y un doméstico: *Lama guanicoe* (el guanaco silvestre y ancestral) y *Lama glama* (la llama doméstica descendiente del guanaco), *Vicugna vicugna* (la vicuña silvestre y ancestral) y *Vicugna pacos* (la alpaca doméstica descendiente de la vicuña) (Cuadro 1). Subsecuentemente, esta propuesta ha sido aceptada por los especialistas en taxonomía de animales domésticos (Gentry *et al.*, 2004).

En el mismo año, Wheeler *et al.* (2001) demostraron la existencia de cuatro agrupaciones genéticamente y geográficamente distintas de vicuñas en el país. Sin embargo, es solamente con la publicación de Marín *et al.* (2007) que se confirmó la división subespecífica de la vicuña en *Vicugna vicugna vicugna* (distribución

correspondiente al llamado “diagonal seco” desde aproximadamente 20°S en la cordillera oeste y 25°S en la cordillera este en su extensión norteña y 26°S en la cordillera oeste y 29°S en la cordillera este en su extensión sureña) y *Vicugna vicugna mensalis* (con distribución al norte del “diagonal seco” hasta aproximadamente 8°S). Esta publicación se caracteriza por el gran número y amplia distribución de las muestras estudiadas (en total 423), en contraste con los estudios de Norambuena y Paredes (2003) y Sarno (2004) que llegaron a la conclusión de que solamente existe una subespecie de vicuña: *Vicugna vicugna*.

Cuadro 1. Clasificación taxonómica de la alpaca

Clasificación taxonómica de la alpaca	
Reino	Animalia
Filo	Chordata
Clase	Mammalia
Orden	Artiodactyla
Familia	Camelidae
Género	Vicugna
Especie	<i>Vicugna pacos</i>

El Perú tiene más de cuatro millones de alpacas (*Vicugna pacos*) y es el primer productor de esta especie en el mundo. La alpaca, desde su domesticación en los Andes centrales, hace 7000 años, cumple un rol importante en la economía rural (Wheeler, 1995), pues más de 250 000 comunidades campesinas localizadas por encima de los 3800 msnm dependen de la crianza de la alpaca como su principal o única fuente de ingresos. Estudios arqueológicos han demostrado la ocurrencia de alta mortalidad neonatal durante el proceso de domesticación y, al parecer, este problema sigue vigente, limitando seriamente la adecuada explotación de la alpaca en ambientes climáticos extremos como los Andes peruanos (Wheeler, 1995).

2.2. Avances en el estudio de la inmunología de crías de alpaca

La construcción de árboles filogenéticos y las herramientas de la biología moderna han permitido obtener información y esclarecer interrogantes evolutivas respecto a la

composición biológica de los organismos, desde el aspecto microscópico y celular hasta el macroscópico y fenotípico. Asimismo, el desarrollo de nuevas técnicas moleculares desde la década de los noventa ha permitido la clonación de varias citoquinas, su análisis y cuantificación, y el conocimiento de sus aspectos estructurales y funcionales, especialmente, en humanos y murinos.

La información molecular de las secuencias de aminoácidos y nucleótidos han permitido inferir sobre las relaciones filogenéticas entre organismos. Los análisis filogenéticos han identificado tres subórdenes dentro del orden Artiodactyla: (I) Suiformes (cerdos, pecaríes e hipopótamos), (II) Tylopoda (camellos, llamas, vicuñas, alpacas y guanacos) y (III) Ruminantia (alces, ciervos, cabras, ovejas, jirafas) (Odbileg *et al.*, 2005b). Interesantemente, las secuencias de aminoácidos de IL-10 de la llama (*Lama glama*, orden *Artiodactyla*) están estrechamente relacionadas a las del caballo (orden *Perissodactyla*), humano (*Primates*), vaca (suborden *Ruminantia*) y cerdo (suborden *Suiformes*), basado en que los residuos Cys de IL-4, IL-10 e IL-13 en esta especie se encuentran localizados en la misma posición en los vacunos, cerdos, caballos y humanos, respectivamente (Odbileg *et al.*, 2005a). Además, el análisis filogenético de IL-2, IL-4, IL-12, IL-13 e IFN- γ indica que los subórdenes Suiformes y Tylopoda se relacionan estrechamente con el orden Artiodactyla (Odbileg *et al.*, 2006).

Desde la década del 2000 se han venido realizando estudios a nivel molecular de perfiles de citoquinas de la inmunidad innata y adaptativa; en esta última, de las subpoblaciones linfocitarias Th1 y Th2 de llamas (*Lama glama*) y camellos bactrianos (*Camelus bactrianus*), especies filogenéticamente emparentadas con las alpacas (*Vicugna pacos*), basados en el clonamiento y secuenciamiento de los genes involucrados en la inmunidad adquirida, y el establecimiento de las secuencias aminoacídicas de las citoquinas de estas especies con la finalidad de compararlas con las de otras. En dichos estudios se ha logrado examinar simultáneamente varias de estas citoquinas y el balance de la respuesta Th1/Th2, las que han revelado respuestas funcionalmente complejas en procesos infecciosos sistémicos (Odbileg *et al.*, 2005a, 2005b, Odbileg *et al.*, 2006; Odbileg *et al.*, 2008).

Tomando como referencia los oligonucleótidos empleados en estos estudios, el Laboratorio de Microbiología y Parasitología Veterinaria, sección Inmunología, de la

Facultad de Medicina Veterinaria de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos, ha brindado alcances respecto a la cinética de la expresión *in vitro* de algunas citoquinas de alpacas (*Vicugna pacos*), aquellas más representativas de la respuesta inmune innata (IL-1a, IL-1b, IL-6, TNF- α) (Bardález *et al.*, 2013; Tambillo *et al.*, 2013; Hinostroza *et al.*, 2015) y adaptativa (IL-2, IFN- γ , IL-4, IL-10) (Chiok, 2012; More, 2013; Watanabe *et al.*, 2014; Watanabe, 2015). Asimismo, se ha determinado la presencia genómica de defensinas α (*Defa 8*) y β (*β -def alp*) y sus niveles de expresión como ARN mensajeros en yeyunos de crías de alpacas menores de 45 días de edad (More *et al.*, 2011; Siuce *et al.*, 2015); así como la detección del exón 1 de la región Fc IgA de la alpaca y la cinética de expresión de esta inmunoglobulina (Dionisio *et al.*, 2014).

La interpretación del éxito en la amplificación del producto deseado se debe a que los camellos, las llamas, los guanacos, las vicuñas y las alpacas se encuentran filogenéticamente emparentados, además de pertenecer todos a la única familia *Camelidae* del suborden *Tylopoda*, orden *Artiodactyla* (Ursing *et al.*, 2000), sumado a la masiva hibridación ocurrida entre llamas y alpacas en el país, en un rango de 80 a 92% del total de ejemplares a nivel nacional, resultados obtenidos mediante el análisis del ADN por microsatélites (Wheeler, 2010).

2.3. Avances en el estudio de enteropatías en crías de alpaca

El término de “enteritis neonatal” es utilizado para describir las enfermedades que cursan con disfunción intestinal, usualmente asociada a diarrea, principalmente debido a la sobreestimulación de la función secretora de las criptas epiteliales (salmonelosis, colibacilosis), interferencia con la absorción (enteritis viral), incremento de la permeabilidad (enteritis clostridial) e hipermotilidad (Ramírez, 1991).

Las enfermedades que originan mayor mortalidad en crías de alpaca son las diarreas, neumonías y septicemias (Ameghino y DeMartini, 1991). El término diarrea neonatal se refiere a un proceso específico que afecta a los animales en las primeras semanas de vida, incluyendo este periodo la mortalidad perinatal (0-7 días de edad), la mortalidad neonatal (hasta los 30 días de edad) y mortalidad de crías mayores de un mes hasta el

destete (hasta los 6 a 8 meses de edad) (Rosadio, 2010a, 2010b), y se caracteriza por la aparición de diarrea, ausencia de fiebre, progresiva deshidratación y acidosis, postración y pérdida de peso, progresando a caquexia y muerte de los animales. En el estudio de Ameghino y DeMartini (1991) en los departamentos de Junín y Puno, se evidenció que la mayor frecuencia de mortalidad ocurría en la etapa neonatal, siendo críticos los primeros 30 días de edad.

“La recolección y análisis de informes mensuales de mortalidad neonatal evidencia que las mayores mortalidades ocurren en animales neonatos hasta los 30 días de edad. En Puno y en la Sierra central predominan las muertes por enfermedades infecciosas y no infecciosas, respectivamente. Las causas de muerte en el departamento de Puno se circunscriben principalmente a enterotoxemia y neumonías agudas, mientras que en las empresas de la Sierra Central predominan las muertes perinatales y las ocasionadas por depredadores. Las diferentes causas de muertes en ambas zonas geográficas probablemente reflejan una sobrepoblación animal en las organizaciones puneñas o mejores sistemas de manejo en las dos empresas de la Sierra Central, las que básicamente se dedican a la producción ovejera con un amplio historial de adecuado manejo sanitario y reducida mortalidad de corderos” (Rosadio *et al.*, 2012).

En general, las diarreas neonatales son procesos de alta morbilidad y mortalidad muy variable, siendo particularmente mórbidas en llamas y alpacas neonatas, cuya etiología es multifactorial e involucra un manejo de hato deficiente e irresponsable, que incide en el nivel de inmunidad calostrual adquirido por los neonatos en las primeras horas de vida y las condiciones higiénicas de las instalaciones, factores nutricionales como la sobrealimentación y una variedad de enteropatógenos (bacterias, virus y parásitos) (Cid y Martín, 2010). Una característica biológica determinante en la aparición de cuadros infecciosos en crías de alpacas radica en su condición hipogammaglobulinémica al nacimiento debido a la placentación epiteliocorial difusa de los camélidos (Martín *et al.*, 2010). El calostro de los camélidos contiene, principalmente, inmunoglobulina G (IgG) y la eficacia de su absorción disminuye hasta las 24 horas de vida. Las concentraciones de IgG aumentan rápidamente después de la ingestión del calostro en las crías, alcanzando un pico entre las 24 y 48 horas de vida y declinando de forma continuada (Wernery, 2001). Por lo tanto, la falla en la transferencia pasiva de inmunoglobulinas

presentes en el calostro ha sido asociada a mortalidad en crías de alpacas (Garmendia *et al.*, 1987).

Las diarreas neonatales han sido poco estudiadas en el Perú y generalmente son reportadas como colibacilosis o enteritis (Ameghino y DeMartini, 1991). La información existente evidencia la presencia de *Clostridium perfringens*, *Eimeria spp.*, *Cryptosporidium spp.* y *E. coli* como potenciales patógenos causales (Ameghino y DeMartini, 1991).

Los enteropatógenos reportados y estudiados en camélidos sudamericanos incluyen agentes virales como rotavirus (Parreño *et al.*, 2001; Cebra *et al.*, 2003; Mercado *et al.*, 2004; Rojas *et al.*, 2016) y coronavirus (Cebra *et al.*, 2003; Whitehead y Anderson, 2006; Waitt *et al.*, 2008; Genova *et al.*, 2008; Rojas *et al.*, 2016), bacterianos como *Escherichia coli* (Ramírez *et al.*, 1985a; Twomey *et al.*, 2008; Luna *et al.*, 2012; Rojas *et al.*, 2016), *Salmonella spp.* (D'Alterio *et al.*, 2003; Saulez *et al.*, 2004) y *Clostridium perfringens* (Ramírez *et al.*, 1985b; Ramírez, 1991; Pérez, 2006; Pérez, 2010; Rosadio *et al.*, 2012), y parasitarios como *Cryptosporidium spp.* (Rulofson *et al.*, 2001; Cebra *et al.*, 2003; Whitehead y Anderson, 2006; Twomey *et al.*, 2008; Waitt *et al.*, 2008; Foster *et al.*, 2008; Palacios, 2008; López-Urbina *et al.*, 2009; Molina, 2009; Villacorta *et al.*, 2009; Rojas *et al.*, 2016), *Giardia duodenalis* (Cebra *et al.*, 2003; Rulofson *et al.*, 2001; Whitehead y Anderson, 2006) y *Eimeria spp.* (Rosadio y Ameghino, 1994; Cebra *et al.*, 2003; Whitehead y Anderson, 2006; Cebra *et al.*, 2007a, 2007b; Cafrune *et al.*, 2009; Rosadio *et al.*, 2010; Rojas *et al.*, 2016).

Según Genova *et al.* (2008), los patógenos potenciales que suelen cursar con diarrea en camélidos sudamericanos menores de 7 meses de edad incluyen coronavirus (42%), *Giardia spp.* (18%), *Eimeria spp.* (13%), *Cryptosporidium spp.* (9%), rotavirus (2%) y nemátodos (2%). Whitehead y Anderson (2006) señalan como patógenos más comunes a coronavirus, *E. coli*, *Cryptosporidium spp.*, *Giardia spp.*, y las coccídeas.

Por otro lado, Rosadio *et al.* (2012) señalan como principales agentes causales de morbilidad y mortalidad en alpacas neonatales asociadas a procesos entéricos en el sur peruano al *Clostridium perfringens* tipo A, *E. macusaniensis* y *E. coli*. El *C. perfringens* tipo A es considerado el agente prevalente en fatalidades asociadas con enterotoxemia,

lográndose identificar por primera vez la presencia del gen secundario $\beta 2$ (Pérez, 2006). El análisis *in vitro* argumenta la existencia de cepas con tres perfiles en la actividad fosfolipídica (alta, mediana y baja), mostrando que las cepas de medianas y altas producciones fueron capaces de producir lesiones intestinales en conejos pero incapaces de producir similares lesiones en crías de alpacas (Pérez, 2010).

Estudios histopatológicos revelan la coexistencia de *Clostridium* y *E. macusaniensis* en lesiones de enteritis hemorrágica en muestras intestinales de crías muertas por enterotoxemia, sugiriendo a las infecciones coccidiales como posibles agentes desencadenantes de fatalidades conocidas como enterotoxemia (Palacios, 2006; Rosadio *et al.*, 2010c); es decir, las lesiones de tipo necróticas y hemorrágicas observadas comúnmente en lesiones atribuidas a enterotoxemia podrían ser producto de multiplicaciones eimeriales, predisponiendo a coinfecciones microbiológicas incluyendo infecciones clostridiales (Rosadio *et al.*, 2010c) en las que el efecto de las toxinas desempeñaría el papel patológico descrito en diversos estudios.

Por otro lado, estudios realizados en hisopados clínicos o contenidos intestinales han identificado molecularmente cepas de *E. coli* patogénicas (enteropatógenicas y enterohemorrágicas) (Luna *et al.*, 2012). Adicionalmente, en casos clínicos de diarreas neonatales, mediante inmunofluorescencia directa y PCR, se ha detectado *Giardia intestinalis* coexistiendo con cepas de *E. coli* enteropatógenicas (Gómez-Couso *et al.*, 2011), así como un *coronavirus* similar al virus bovino (Rosadio *et al.*, 2012). Estos patógenos son potenciales causantes de procesos diarreicos en animales incluyendo a poblaciones humanas.

En el estudio de Palacios *et al.* (2005) se realizó la evaluación macro y microscópica de crías de alpacas muertas con enteritis, sin signos de autólisis, del Centro Experimental La Raya – Universidad Nacional San Antonio Abad del Cusco (UNSAAC) (Cusco, Perú). De 48 casos evaluados histopatológicamente, a la necropsia 30 fueron compatibles con enterotoxemia, 11 con eimeriosis y siete con colibacilosis. En dos casos se apreciaron estructuras basófilas de 3 a 4 micras de diámetro en el ápice de las vellosidades y en las criptas de Lieberkühn del yeyuno e íleon, compatibles con *Cryptosporidium sp.* En cuatro casos se observaron formas intracelulares (trofozoítos, esquizontes y gamontes) de *E. macusaniensis* en el yeyuno medio, yeyuno final e íleon

y en algunos casos en el ciego y colon, asociados a procesos compatibles con enterotoxemia. En los treinta casos compatibles con enterotoxemia sin participación de coccídeas, solamente se observaron numerosos bacilos grampositivos de morfología compatible con *Clostridium perfringens* en la mucosa necrosada. Siete casos de eimeriosis no estuvieron complicados con enterotoxemia, observándose esquizontes (Ez) de *E. alpaca*, *E. punoensis* y *E. lamae* en yeyuno final (distal) e íleon, al igual que macrogamontes (Ma) y microgamontes (Mi) de *E. alpaca* y *E. punoensis*. Asimismo, se evidenciaron tanto Ez, Mi y Ma de *E. macusaniensis* en el yeyuno medio, yeyuno distal e íleon, y trofozoítos en yeyuno inicial (proximal) y yeyuno medio.

Es importante el conocimiento de los tipos de agentes infecciosos involucrados y las edades en los que estos patógenos tienen mayor probabilidad de causar enfermedad a fin de desarrollar las pruebas diagnósticas pertinentes que conduzcan a la ejecución de un tratamiento eficiente. Asimismo, fallas en el diagnóstico de la enfermedad y, por ende, en el tratamiento, conllevan a diarreas crónicas que resultan en una falla renal crónica. Es sabido también que la absorción deficiente de inmunoglobulinas del calostro durante las primeras 12 horas de vida del animal incrementa su susceptibilidad a estos agentes.

2.4. Inmunidad en la mucosa intestinal

La mayoría de nuestros conocimientos sobre inmunidad parte de años de experiencia en vacunación intramuscular exitosa, lo que nos ha brindado un panorama bastante claro de cómo actúa el sistema inmune ante una infección dentro del organismo. Los mecanismos de resistencia (inflamación, complemento, fagocitosis) trabajan de manera coordinada con el sistema inmune para detectar, confinar, destruir, eliminar y reparar el daño causado por microorganismos, parásitos y células propias aberrantes, y lo hace a través de una inmunidad que genera memoria. En contraste con lo que ocurre dentro de nuestro organismo (por ejemplo, en el bazo, el hígado o el riñón, donde es intolerable la presencia de agentes extraños o células transformadas), en las mucosas, por ser una interfase entre el interior y el exterior de nuestro cuerpo, normalmente se encuentran grandes cantidades de moléculas extrañas y microorganismos. Así, el sistema inmune de las mucosas debe inducir: a) una respuesta especializada que genere tolerancia o no

reacción contra las moléculas benéficas, b) una respuesta inmune no esterilizante para la flora normal y c) una inmunidad esterilizante contra los patógenos. Esta triple función determina las diferencias principales entre el sistema inmune interno y el de las mucosas, por lo que las funciones principales del sistema inmune de las mucosas son la inducción de tolerancia, la adaptación al medio y a la protección (Vega, 2007).

La descripción anatómica del sistema inmune de las mucosas es un paso preliminar para la elucidación de su fisiología. Los estudios realizados *in vivo* en la mucosa intestinal han sido abundantes y detallados. Sin embargo, la descripción de la organización de las células del sistema inmune en la mucosa ha sido efectuada sólo hace un par de décadas atrás (Vega-López *et al.*, 1993).

El sistema inmunitario intestinal constituye la parte más extensa y compleja del sistema inmunitario. Recibe diariamente una enorme carga antigénica y es capaz de distinguir entre patógenos invasivos y antígenos inocuos procedentes de los alimentos y de bacterias comensales. Los mamíferos superiores han evolucionado a un único sistema inmune de mucosas (MIS, *mucosal immune system*) a fin de proteger la vasta superficie cubierta de secreciones externas y que está expuesta a un ambiente hostil. El epitelio intestinal consiste en una capa simple cubierta de moco y productos antimicrobianos que fortalecen ambos componentes de la defensa inmune innata y adaptativa del hospedero, sumado a la microbiota natural que habita en distintos nichos, es decir, el intestino delgado y colon, la piel, las cavidades nasal y oral, y el tracto reproductivo femenino. La población microbiana más grande puede alcanzar los 10^{12} bacteria/cm³ y ocurre en el intestino grueso humano (McGhee JR y Fujihashi, 2012). El intestino posee mecanismos de defensa que limitan el acceso de sustancias nocivas al organismo. Esta barrera intestinal está integrada por diversos elementos como enzimas digestivas pancreáticas, el epitelio intestinal y las bacterias que constituyen la flora intestinal. Sin embargo, la barrera más efectiva está constituida por el tejido linfoide asociado al intestino o GALT (*Gut-associated lymphoid tissue*) (Ramiro-Puig *et al.*, 2008).

La bacteria intestinal crece por la digestión de carbohidratos complejos, proteínas, vitaminas y otros componentes por la absorción del hospedero, la que da en retribución el desarrollo de la inmunidad natural y tolerancia. Finalmente, la microbiota influye en

el desarrollo y maduración de las células dentro de los tejidos linfoides del MIS (McGhee JR y Fujihashi, 2012).

Nuestra respuesta hacia la flora normal de las mucosas está acotada, es decir, el sistema inmune de las mucosas sólo reacciona lo suficiente para evitar su entrada al organismo, sin destruirla o eliminarla (Brandtzaeg, 2002), y lo hace a través de un mecanismo denominado “exclusión inmune mediado por anticuerpos de isotipo IgA”. No obstante, ante la llegada de un patógeno y la liberación de sus productos se desencadena un proceso inflamatorio local y una respuesta inmune mucosal vigorosa que, en la mayoría de los casos, también produce inmunidad sistémica. Esta característica hace a la inmunización mucosal ideal para inducir ambos tipos de respuesta (local y sistémica) confiriendo una protección integral (Vega, 2007).

Las células epiteliales de la mucosa son de importancia central en la defensa del hospedero al proveer inmunidad innata, así como una barrera física. Las células de goblet, por ejemplo, secretan moco que forma una capa densa protectora que recubre todo el epitelio. La peristalsis iniciada por el ribete en cepillo del tracto gastrointestinal permite que los contenidos alimenticios sean digeridos y absorbidos a través de su recorrido en el intestino. Los enterocitos dañados, infectados o apoptóticos son llevados hasta el borde apical de las microvellosidades y excretados, se forman nuevas células epiteliales a nivel de las criptas y migran desde la zona basal de la microvellosidad hacia la zona apical. Las células de Paneth en la región de las criptas producen péptidos antimicrobianos (AMPs, *antimicrobial peptides*) denominados defensinas α , mientras que las células epiteliales producen defensinas β . Un componente principal del epitelio de la mucosa lo constituyen los linfocitos intraepiteliales (IELs, *intraepithelial lymphocytes*), los que consisten en varios subconjuntos de células T que interactúan con las células epiteliales a fin de mantener la homeostasis. La regulación es bidireccional, desde que las células epiteliales pueden influir también en el desarrollo de los linfocitos T intraepiteliales y en su función (McGhee JR y Fujihashi, 2012).

2.4.1. Sitios inductores y efectores

El sistema inmune de mucosas puede ser separado en *sitios inductores* y *sitios efectores* en base a sus propiedades funcionales y anatómicas. En la mucosa

gastrointestinal existen sitios especiales para la estimulación de la respuesta inmune, llamados sitios inductores, y otros en donde se desarrolla la función inmune, denominados sitios efectores (Vega, 2007). La migración de las células inmunes desde la mucosa inductora a los tejidos efectores a través del sistema linfático constituye la base celular para la respuesta inmune en los tractos gastrointestinal, urinario y reproductivo femenino. Los sitios inductores incluyen el tejido linfoide asociado a intestino (GALT, *gut-associated lymphoid tissue*) y el tejido linfoide asociado a nasofaringe (NALT, *nasopharyngeal-associated lymphoid tissue*). En conjunto, estos comprenden la red de tejido linfoide asociado a mucosa (MALT, *mucosa-associated lymphoid tissue*) para la provisión de una fuente continua de células B y T de memoria que se dirigen a los sitios efectores (McGhee JR y Fujihashi, 2012).

2.4.1.1. Anatomía y composición celular del GALT

Anatómicamente, el GALT se divide en dos compartimentos: a) GALT organizado, inductor de la respuesta inmunitaria intestinal, constituido por folículos linfoides asociados o placas de Peyer y nódulos linfáticos mesentéricos; y b) GALT difuso, efector de la respuesta inmunitaria, integrado por poblaciones de linfocitos dispersos en el entramado epitelial (*intraepithelial lymphocytes*, IEL) o en la lámina propia intestinal (*lamina propria lymphocytes*, LPL) (Ramiro-Puig *et al.*, 2008).

El GALT ejerce un papel defensivo muy importante en el intestino, el cual se encuentra constantemente expuesto a una elevada carga antigénica. Su particular estructura diferenciada en tejido organizado (placas de Peyer y linfonódulos mesentéricos) y tejido difuso (linfocitos intraepiteliales y linfocitos de la lámina propia) permite el desarrollo de una respuesta eficaz y adecuada al tipo de estímulo, es decir, frena patógenos invasivos e induce tolerancia oral en respuesta a antígenos inocuos procedentes de la dieta y del propio epitelio intestinal. Los anticuerpos secretados, fundamentalmente de isotipo IgA, constituyen también un mecanismo de defensa característico y común en todas las mucosas del organismo (Ramiro-Puig *et al.*, 2008).

Las placas de Peyer (PP) intestinales son los sitios inductores reconocidos del tejido linfoide asociado al intestino (GALT) y están formadas por agregados linfoides macroscópicos situados en la cara antimesentérica de la mucosa intestinal. El tejido

linfoide está separado del lumen intestinal por una monocapa de células (*folicle-associated epithelium*, FAE) formada por células epiteliales columnares, células M, linfocitos intraepiteliales y células de goblet (caliciformes) (Ramiro-Puig *et al.*, 2008). En el epitelio de esas placas existen células especializadas (células M) que se encargan de “muestrear” el contenido del tracto intestinal. Las células M son enterocitos especializados en la captación de antígenos lumbinales, carecen de recubrimiento de glicocálix y en su superficie luminal presentan pliegues en lugar de las microvellosidades características del resto de enterocitos. Por debajo del epitelio asociado a folículo (FAE) yace una región difusa denominada cúpula subepitelial (*subepithelial dome*), integrada por células dendríticas y algunos macrófagos. Las áreas interfoliculares están compuestas por linfocitos T, mayoritariamente de tipo colaborador o helper (Th), células dendríticas maduras y macrófagos. Inmersos en la placa de Peyer se encuentra una multitud de folículos integrados por linfocitos B IgM⁺, precursores de células plasmáticas productoras de IgA y en los centros germinales de estos folículos se generan linfocitos B IgA⁺ memoria. A diferencia del resto de órganos linfoides, las placas de Peyer sólo se presentan vasos linfáticos eferentes (Ramiro-Puig *et al.*, 2008).

Por debajo del epitelio de las placas de Peyer se encuentran abundantes células dendríticas (DC) con capacidad fagocítica, que expresan en su superficie moléculas del complejo principal de histocompatibilidad (MHC, *major histocompatibility complex*) que las capacita como células presentadoras de antígeno (APC, *antigen-presenting cells*). Después de captar los antígenos, esas células los procesan intracelularmente y migran hacia el interior de las placas de Peyer para interactuar con los linfocitos T presentándoles esos antígenos para iniciar la respuesta inmune. Una vez realizada la activación, los linfocitos T y los B específicos contra el antígeno (Ag) proliferan y abandonan el sitio inductor a través de la linfa llegando a los nódulos linfáticos regionales (mesentéricos). De ahí viajan a través de la sangre y llegan a las otras mucosas del organismo como la glándula mamaria y los tractos respiratorio y genitourinario. Finalmente, la mayoría de esas células llegan a la lámina propia intestinal a través de este mecanismo de recirculación de células conocido como ecotaxia (*homing*), mediado por moléculas que se expresan en la superficie de los linfocitos mucosales y el endotelio alto de las vénulas sanguíneas de las mucosas. De esta manera, al menos en teoría, las principales mucosas del organismo quedan

protegidas contra un patógeno determinado a través del sistema inmune mucosal común (MALT) (Vega, 2007).

El MALT contiene regiones de células T, áreas enriquecidas de células B albergando una alta frecuencia de células B de superficie positiva de IgA (sIgA⁺), y un área subepitelial con células presentadoras de antígeno (APC), incluyendo células dendríticas para la iniciación de respuestas inmune específicas. El MALT es cubierto por un conjunto de células diferenciadas con micropliegues (células M), células epiteliales, pero no con células de goblet y células linfoides subyacentes que presentan un papel importante en el inicio de la respuesta inmune de mucosas. Las células M toman los antígenos (Ag) tanto del lumen intestinal como de la mucosa nasal y los transporta a las células dendríticas subyacentes. Las células dendríticas transportan los antígenos a los sitios inductores de la placa de Peyer o vía linfática a los linfonódulos mesentéricos (MLNs) para la iniciación de las respuestas de células T y B de la mucosa. El ácido retinoico (RA) producido por las células dendríticas potencia la expresión de receptores homing mucosales ($\alpha_4\beta_7$ y CCR9) en las células T activadas para su subsiguiente migración a través de los vasos linfáticos, la sangre y dentro de la lámina propia del tracto gastrointestinal. La regulación dentro del sistema inmune de mucosas es crítica, muchos subconjuntos de células T incluyendo Th1, Th2, Th17 y T reguladores sirven para este propósito (McGhee JR y Fujihashi, 2012).

Las células activadas llegan a las mucosas para su diferenciación final y se convierten en células efectoras, ya sea células plasmáticas productoras de anticuerpos en el caso de los linfocitos B o células productoras de citoquinas en el caso de los linfocitos T. Los lugares de la mucosa que alojan a las células efectoras y las de memoria se denominan *sitios efectores*. El tejido linfoide asociado a los bronquios (BALT) en el tracto respiratorio y la lámina propia en el gastrointestinal son los sitios efectores reconocidos de esas mucosas. Ya que las células de memoria también se alojan en estos sitios, se les considera los lugares de recapitulación de la experiencia inmune del organismo; inclusive se les ha llamado también órganos linfáticos terciarios (Vega, 2007).

Los sitios efectores en la mucosa, incluyendo las regiones de la lámina propia del tracto gastrointestinal, el tracto urogenital y el tracto reproductivo femenino, así como

los tejidos de las glándulas secretorias (mamario, lacrimal, salivar, etc.), contienen células efectoras mucosales específicas para antígeno como las células plasmáticas productoras de IgA, células B de memoria y células T (Brandtzaeg, 2007). La respuesta inmune mucosal adaptativa resulta de los linfocitos T CD4⁺ (Th1 o Th2), que favorecen el desarrollo de células plasmáticas productoras de IgA. Nuevamente, las células epiteliales se convierten en elementos importantes en el MIS al producir los receptores poliméricos de Ig (pIgR) que se unen a las inmunoglobulinas A y M (Brandtzaeg, 2010). La pIgA de la lámina propia se une al pIgR en la superficie basal de las células epiteliales, la pIgA unida es internalizada y luego transportada apicalmente a través de las células epiteliales. La liberación de pIgA unida a una porción del pIgR da lugar a la IgA secretoria (anticuerpos S-IgA) con especificidades a varios antígenos encontrados en los sitios inductores de la mucosa. Asimismo, las bacterias comensales son ingeridas por células dendríticas epiteliales, las que subsecuentemente migran a los nódulos linfáticos mesentéricos para inducir respuestas de células B con IgA independientes de células T (Macpherson y Uhr, 2004). En resumen, dos amplios tipos de anticuerpos S-IgA alcanzan nuestras secreciones externas al ser transportados a través de las células epiteliales y protegiendo las superficies epiteliales del medio ambiente, incluyendo las enfermedades infecciosas (McGhee JR y Fujihashi, 2012).

Los nódulos linfáticos mesentéricos se localizan en el mesenterio del intestino y se dividen, estructuralmente, en tres regiones con distinta composición celular: corteza, paracorteza y médula. La corteza contiene folículos primarios y secundarios ricos en linfocitos B y células dendríticas. Por el contrario, la paracorteza se caracteriza por una elevada proporción de linfocitos T y células dendríticas. La médula está integrada por linfocitos T y B y células plasmáticas. Los linfocitos T vírgenes circulantes llegan al nódulo a través de vénulas poscapilares especializadas denominadas vénulas endoteliales altas. El paso de linfocitos T a la paracorteza a través de estas vénulas está dirigido por quimiocinas que se unen a los receptores de la célula T virgen y que son producidas por células endoteliales, células del estroma y células dendríticas. En la corteza, las células dendríticas residentes internalizan y procesan los antígenos que llegan a través de la linfa. Las células dendríticas maduras migran hacia la paracorteza donde presentan el antígeno a los linfocitos Th o T citotóxicos (Tc) vírgenes y de esta forma se originan células T especializadas y se inicia la respuesta inmunitaria adaptativa. Mientras que los linfocitos efectores abandonan los nódulos linfáticos y

migran hacia los tejidos no linfoides, algunos linfocitos Th permanecen en el nódulo linfático como células memoria o migran hacia los centros germinales de los folículos para promover el proceso final de diferenciación de los linfocitos B (Ramiro-Puig *et al.*, 2008).

Los linfocitos intraepiteliales (IEL) residen en los espacios intraepiteliales del intestino, bajo las uniones estrechas y por encima de la membrana basal. Si consideramos la gran superficie de la mucosa intestinal ($\sim 400\text{m}^2$) y su proporción respecto a células epiteliales, los IEL representan una población muy abundante de células inmunocompetentes. Aunque los IEL constituyen una población muy heterogénea, la mayor parte presenta un fenotipo supresor o citotóxico atípico y específico del compartimiento mucosal ($\text{CD8}^{\alpha+}$), que difiere del resto de órganos linfoides donde predominan otros fenotipos más convencionales CD4^+ y $\text{CD8}\alpha\beta^+$). A pesar de que hoy en día su origen y desarrollo continúan en discusión, se sabe que presentan un fenotipo activado típico de células efectoras/memoria con capacidad inmunorreguladora, y que proporcionan una respuesta inmediata y muy efectiva sobre células epiteliales infectadas. El conjunto de las diversas subpoblaciones de IEL desempeña un papel crucial en la prevención de la sensibilización a antígenos lumenales, es decir, son mediadores del proceso de tolerancia oral (Ramiro-Puig *et al.*, 2008).

Por otra parte, la lámina propia, comprendida entre el epitelio y la capa muscular, contiene células plasmáticas maduras productoras de IgA, linfocitos T (principalmente Th) y otros tipos celulares como macrófagos, células dendríticas y mastocitos. Estas poblaciones se encuentran en estado continuo de migración, diferenciación y renovación (Ramiro-Puig *et al.*, 2008).

Las dos poblaciones efectoras mucosales, linfocitos intraepiteliales (IEL) y linfocitos de la lámina propia (LPL), se hallan bajo la influencia de bacterias comensales presentes en el intestino, las cuales contribuyen al desarrollo de su función inmunitaria. En este sentido, la flora bacteriana intestinal promueve la expansión y adquisición de la actividad citotóxica de los linfocitos del epitelio intestinal y desarrolla un papel importante en la inducción y mantenimiento de la tolerancia oral frente a antígenos presentes en la dieta, mediante la potenciación de la producción de IgA por parte de los

linfocitos de la lámina propia. Los microorganismos comensales interaccionan también con células presentadoras de antígeno (APC) del epitelio y lámina propia, promoviendo una interacción diferente en los linfocitos Th e inducen así la activación de células reguladoras y con ello se desarrolla la tolerancia ante estos microorganismos (Ramiro-Puig *et al.*, 2008).

2.4.2. Respuesta inmunitaria en la mucosa intestinal

2.4.2.1 Captación de antígenos lumbinales

Los antígenos lumbinales pueden penetrar en la mucosa intestinal y alcanzar el GALT a través de distintas vías. La entrada a través de células M presentes en las placas de Peyer constituye la vía más conocida. La membrana apical de las células M está diseñada para favorecer la adhesión y captación de antígenos lumbinales como macromoléculas, partículas adhesivas, virus y bacterias. Las células M también pueden captar ciertas proteínas alimentarias e IgA. Una vez efectuada la captación se inicia el proceso de transcitosis: las células M internalizan los antígenos lumbinales mediante mecanismos de endocitosis o fagocitosis y los transportan a través de sus vesículas hacia la membrana basolateral, donde son liberados al espacio extracelular. La membrana basolateral de las células M presenta una profunda invaginación o bolsillo intraepitelial (*intraepithelial pocket*) que alberga linfocitos y macrófagos, encargados de procesar los antígenos para la posterior presentación antigénica (Ramiro-Puig *et al.*, 2008).

Los enterocitos constituyen una segunda posible vía de entrada de antígenos. Presentan menor accesibilidad que las células M debido a su recubrimiento externo de glicocálix rico en enzimas hidrolíticas, hecho que impide la entrada de agregados macromoleculares y microorganismos. Hoy en día se acepta que los enterocitos no sólo son capaces de captar los antígenos solubles que llegan a la superficie celular, sino también, de procesarlos y presentarlos a los linfocitos T. La captación de antígenos lumbinales también puede producirse mediante un mecanismo paracelular a través de los espacios entre enterocitos, donde células dendríticas proyectan sus dendritas gracias a la expresión de proteínas asociadas a las uniones estrechas (Ramiro-Puig *et al.*, 2008).

2.4.2.2. Inducción de la respuesta inmunitaria

Las células M captan y transportan los antígenos lumenales hacia las APC situadas en la cúpula de las placas de Peyer. Las APC interiorizan y procesan los antígenos hasta péptidos antigénicos que se expresarán en la membrana plasmática asociados a moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC) para ser reconocidos por el receptor de células T (TCR). Las APC activadas pueden interactuar con linfocitos T de las áreas interfoliculares de la placa de Peyer o migrar hacia los nódulos linfáticos mesentéricos a través de vasos linfáticos. Una vez activados, los linfocitos Th pueden diferenciarse principalmente en dos subpoblaciones efectoras denominadas Th1 y Th2, con diferente función basada en el perfil de citoquinas que secretan.

Los linfocitos Th1 se caracterizan por la secreción de interferón γ (IFN- γ), interleucina 2 (IL-2) y linfoxina (LIF o TNF- β) y su función principal es la defensa mediada por fagocitos contra infecciones, especialmente frente a microorganismos intracelulares (virus, bacterias y algunos protozoos). Por otra parte, los linfocitos Th2 productores de IL-4, IL-5 e IL-13 actúan como mediadores de reacciones alérgicas y en la defensa frente a infecciones producidas por helmintos y artrópodos. Las citoquinas producidas por estas subpoblaciones no sólo determinan sus funciones efectoras, sino que también participan en su desarrollo y expansión. De esta manera, cada subpoblación se amplifica a sí misma y además ejerce un papel regulador sobre la otra. La tercera subpoblación efectora denominada Th17 se caracteriza por la secreción de IL-17 e IL-6. Aunque sus funciones biológicas no se hallan totalmente clarificadas, dicha subpoblación efectora parece estar implicada en la defensa frente a infecciones bacterianas y fúngicas, no cubiertas totalmente por la respuesta Th1 y Th2 (Ramiro-Puig *et al.*, 2008).

Además de estas tres subpoblaciones efectoras, actualmente está establecida la presencia de linfocitos T reguladores: linfocitos Tr1 productores principalmente de IL-10 y linfocitos Th3 caracterizados por la secreción de factor de transformación del crecimiento β (TGF- β). Estos linfocitos son especialmente importantes en el intestino por su capacidad reguladora de la respuesta inmunitaria durante procesos inflamatorios e infecciosos. Además desempeñan un papel clave en el desarrollo de la tolerancia oral frente a antígenos inocuos procedentes de la dieta y de la microbiota, entendiéndose por

tolerancia oral la ausencia de respuesta inmunitaria sistémica frente a un antígeno, al cual un individuo ha estado previamente expuesto a través del tracto gastrointestinal (Ramiro-Puig *et al.*, 2008).

La diferenciación de linfocitos T vírgenes a subpoblaciones efectoras está condicionada por el tipo de estimulación y en especial por las citoquinas secretadas durante el reconocimiento antigénico. IL-12 es la principal responsable de la diferenciación Th1, mientras que IL-4 promueve la subpoblación Th2. Algunas bacterias extracelulares conducen a la diferenciación Th17 mediante la inducción de la secreción de IL-23 por parte de las APC. Además, los linfocitos T reguladores se originan en respuesta a IL-10 o TGF- β (Ramiro-Puig *et al.*, 2008).

Ciertas citoquinas como IL-4, IL-5 y TGF- β inducen la síntesis de IgA en linfocitos B de los folículos de las placas de Peyer. Estos linfocitos B, precursores de células plasmáticas, migran hacia los nódulos linfáticos mesentéricos donde tiene lugar la maduración y expansión clonal. A continuación, estos linfocitos se dirigen a circulación sistémica a través del conducto torácico. Después de varias recirculaciones, dichos linfocitos migran a los tejidos efectoras, entre ellos la lámina propia intestinal, donde ejercerán su función. Una gran variedad de factores influye en esta migración, entre ellos se encuentran fenómenos generales como irrigación tisular, inflamación, innervación y señales hormonales y también factores específicos como la expresión de moléculas de adhesión de linfocitos, señales estromales, citoquinas, antígenos y producción de quimiocinas por parte del endotelio (Ramiro-Puig *et al.*, 2008).

Los linfocitos T activados en el GALT presentan un patrón de moléculas de adhesión y receptores de quimiocinas diferente al de los linfocitos activados en órganos linfoides periféricos, lo que promueve su movilización hacia mucosas y, en concreto, a aquella donde se inició la respuesta (Ramiro-Puig *et al.*, 2008).

2.5. Inmunidad adquirida: activación y diferenciación linfocitaria

Los linfocitos T responden a fragmentos peptídicos de antígenos proteínicos que les son presentados por células presentadoras de antígenos (APC, *antigen-presenter cell*) a través de las moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC) y expresan coestimuladores como B7.1 (CD80) y B7.2 (CD86) que se unen a la molécula CD28 del linfocito T, estimulándolo al inducir la síntesis de IL-2 por este último y otras citoquinas que regulan positivamente los genes de supervivencia celular, promueven el metabolismo energético y facilitan la división celular (Tizard, 2009). Este evento se denomina *activación* del linfocito T. En consecuencia, el reconocimiento del antígeno induce varias respuestas como la secreción de citoquinas por los linfocitos T, la proliferación de los linfocitos específicos frente al antígeno (lo que se denomina *expansión clonal*) y la diferenciación de las células vírgenes en linfocitos efectores y de memoria. La expansión clonal y la diferenciación proceden con rapidez debido a varios mecanismos de retroalimentación positiva; es así que las citoquinas producidas por los linfocitos T activados estimulan la proliferación y diferenciación del linfocito T en células efectoras, además, estos linfocitos T activados envían señales a la CPA que aumentan la capacidad de las mismas para activar más linfocitos T. Al mismo tiempo, algunas moléculas de superficie (CTLA-4 o CD152) expresadas en los linfocitos T activados, así como las citoquinas secretadas por los mismos (IL-10, TGF- β), tienen funciones reguladoras que sirven para establecer límites seguros a la respuesta (Tizard, 2009; Abbas *et al.*, 2012).

Una función importante de la inmunidad mediada por los linfocitos T es que activan a los macrófagos para eliminar a los microbios intracelulares e inducir respuestas inflamatorias agudas fuertes, más allá de las inducidas directamente por el sistema inmunitario innato, de manera que se atrae a la zona de infección a un ejército lo suficientemente grande de fagocitos. Los microorganismos infecciosos que se unen a los TLR tenderán a favorecer la diferenciación de células T inocentes CD4⁺ en linfocitos Th1 y Th17, los primeros producen IFN- γ que activa a los macrófagos y, los segundos, IL-17 que induce una inflamación rica en neutrófilos. Asimismo, muchos microorganismos extracelulares que ingresan a la sangre activan la vía alternativa del complemento lo que, a su vez, aumenta la producción de anticuerpos por los linfocitos

B. Algunos de estos anticuerpos opsonizan las bacterias y con ello promueven su fagocitosis por los neutrófilos y los macrófagos. En consecuencia, la respuesta inmune humoral se encarga de eliminar a los microorganismos extracelulares, y las citoquinas producidas por las células durante las respuestas inmunitarias innatas frente a estos microorganismos, estimulan la proliferación y diferenciación de los linfocitos en las respuestas inmunitarias adaptativas. En estas últimas, las principales fuentes de citoquinas son los linfocitos T, especialmente, los linfocitos T $CD4^+$ cooperadores (Abbas *et al.*, 2008).

Los linfocitos T $CD4^+$ pueden diferenciarse en tres subconjuntos dicotómicos de células Th dependiendo del microambiente de la célula. El desarrollo de la respuesta inmune involucra una interacción orquestada entre varias líneas celulares. Los antígenos exógenos son procesados por células presentadoras de antígenos profesionales, incluyendo las células dendríticas (DCs, *dendritic cells*), previamente a la presentación a las células T. Cuando las células T $CD4^+$ son expuestas a una estimulación dual de complejos peptídicos del complejo mayor de histocompatibilidad tipo II de DCs y a una apropiada coestimulación, las células T helper inocentes o vírgenes (Th0, *naive T helper cells*) son activadas y pueden, entonces, diferenciarse en células Th1, Th2 (Figura 1) o Th17.

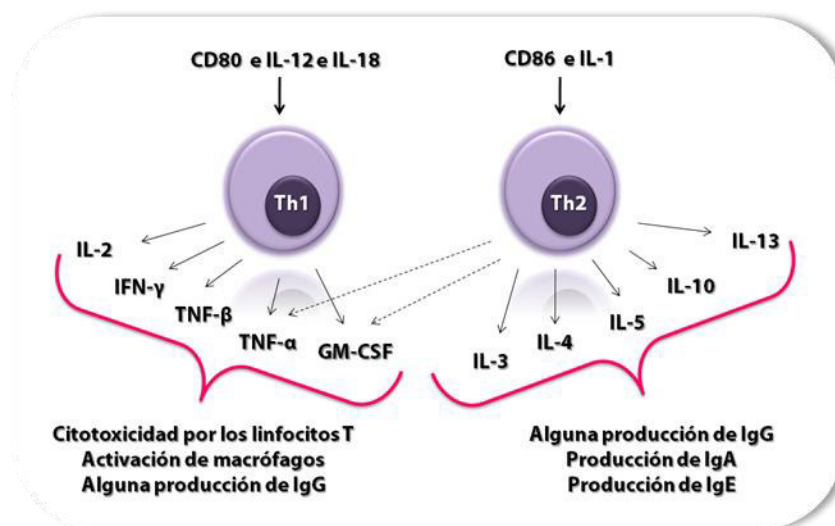


Figura 1. Principales diferencias entre linfocitos Th1 y Th2.

Obsérvese que la coestimulación que desencadena su activación es diferente, así como el conjunto de citoquinas que secretan. Adaptado de Tizard (2009).

Las citoquinas características producidas por los principales subgrupos de linfocitos T CD4⁺ son el INF- γ , la IL-2 y la LT- α (linfotoxina α , antes denominada TNF- β) para los linfocitos Th1; la IL-4, la IL-5, la IL-6, la IL-9, la IL-10 y la IL-13 para los linfocitos Th2; y la IL-17 y la IL-22 para los linfocitos Th17 (Romagnani, 2000; Tylocinski *et al.*, 2005; Tizard, 2009; Abbas *et al.*, 2012). Las citoquinas producidas por estos subgrupos determinan sus funciones efectoras y su participación en las enfermedades. Es importante destacar que estos subgrupos surgen en respuesta a citoquinas presentes en las primeras fases de las respuestas inmunitarias (las que provienen de las células presentadoras de antígenos, sobre todo, células dendríticas y macrófagos; y otras células inmunitarias como linfocitos NK, basófilos y mastocitos), lo que conlleva a la expansión de los subgrupos respectivos.

Los linfocitos Th1 responden de forma eficaz al antígeno presentado por las células dendríticas mieloides (DC1) y por los linfocitos B, utilizando la molécula de coestimulación CD80 (B7.1). Las DC1 activan a los linfocitos Th1 mediante la secreción de IL-12, IL-18 e interferones del tipo I. La activación completa del linfocito Th1, su proliferación y máxima producción de IFN- γ se alcanza por la estimulación adicional de IL-18 (Tizard, 2009) (Figuras 2 y 3), el cual realiza una acción sinérgica con la IL-12 y los interferones de tipo I que también actúan sobre las células dendríticas y los macrófagos para inducir una mayor secreción de IL-12 (Abbas *et al.*, 2012). En ausencia de IL-12, la respuesta de los linfocitos T colaboradores cambia automáticamente de Th1 a Th2 (Tizard, 2009). La secreción de IL-2 e INF- γ por parte de los linfocitos T colaboradores activados se realiza de una manera muy dirigida a través de la sinapsis inmunitaria, mientras que el TNF- α se secreta al medio externo. Probablemente, las citoquinas secretadas a través de la sinapsis inmunitaria desempeñan una labor específica en la comunicación con las otras células, mientras que las que se secretan al exterior facilitan la inflamación y las respuestas sistémicas. Los linfocitos Th1 intervienen en las respuestas inmunes de base celular, como las reacciones de hipersensibilidad retardada y la activación de macrófagos (Tizard, 2002) y están asociadas a las respuestas mediadas contra patógenos intracelulares invasivos (Romagnani, 2000).

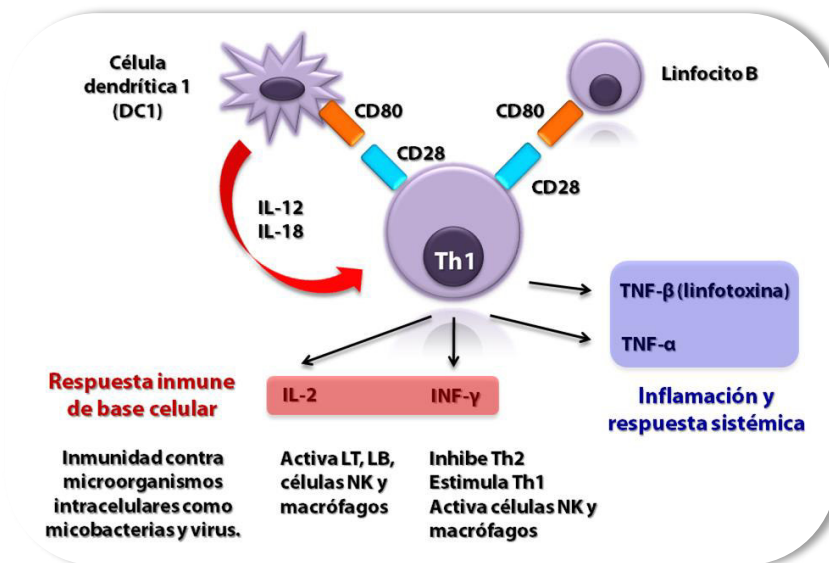


Figura 2. Activación del linfocito Th1. Los linfocitos Th1 responden de forma eficaz al antígeno presentado por las células dendríticas mieloides (DC1) y por los linfocitos B, utilizando la molécula de coestimulación CD80 (B7.1). Las DC1 activan a los linfocitos Th1 mediante la secreción de IL-12, IL-18 e interferones del tipo I y, una vez activados, los linfocitos Th1 secretan IL-2, IFN- γ , TNF- α y linfotóxina (TNF- β).

Los linfocitos Th2 responden de forma eficaz al antígeno presentado por las células dendríticas linfoides (DC2), macrófagos y, en menor grado, al presentado por los linfocitos B. Las células DC2 secretan IL-1 e IL-4 y proporcionan una coestimulación mediada por CD86 (Tizard, 2009). En contraste con las células Th1, las células Th2 secretan una variedad de citoquinas antiinflamatorias (Romagnani, 2000) y regulan las respuestas inflamatorias mediadas a nivel humoral y celular contra patógenos extracelulares, helmintos parásitos, toxinas y otras moléculas solubles extrañas, y la inhibición de varias funciones de los macrófagos, la producción de IgE, como también en la fibrosis tisular, mastocitosis y eosinofilia (Romagnani, 2000; Jarnicki y Fallon, 2003). En individuos con cierta predisposición genética, tales células promueven las reacciones alérgicas contra células animales, polen y contaminantes (Huber *et al.*, 2010). Las citoquinas producidas por los linfocitos Th2 en cultivo incrementan la producción de IgG1 e IgA por los linfocitos B hasta en un factor de 20, y la de IgE hasta en un factor de 1000 (Tizard, 2002). Las respuestas de los linfocitos Th2 se asocian con el aumento de la inmunidad frente a algunos parásitos helmintos como *Toxocara canis*, pero con una menor resistencia frente a micobacterias y otros microorganismos intracelulares. En consecuencia, no tienen efecto sobre las reacciones de hipersensibilidad retardada u otras reacciones mediadas por células (Tizard, 2009).

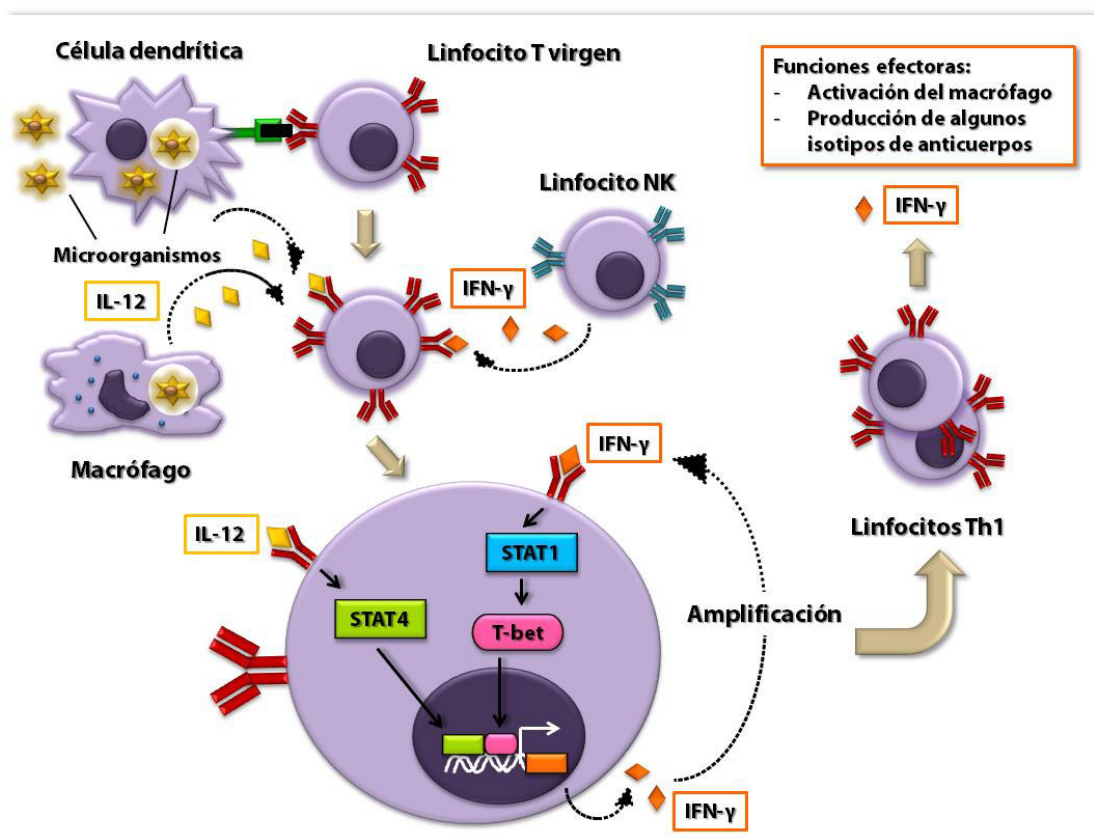


Figura 3. Desarrollo de los linfocitos Th1. La IL-12 producida por las células dendríticas y por los macrófagos en respuesta a los microorganismos, y el IFN-γ producido por los linfocitos NK (todos parte de la respuesta inmunitaria innata inicial a los microbios) activan los factores de transcripción T-bet, STAT1 y STAT4, que estimulan la diferenciación de los linfocitos T CD4⁺ inocentes (o vírgenes) en el subgrupo Th1. El IFN-γ producido por los linfocitos Th1 amplifica esta respuesta e inhibe el desarrollo de los linfocitos Th2 y Th17. Adaptado de Abbas *et al.* (2012).

Ambas células Th1 y Th2 producen cantidades más pequeñas de TNF-α, factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos (GM-CSF) e IL-3. La inhibición cruzada entre las citoquinas de las células Th1 y Th2 polariza respuestas de células T funcionales en respuestas mediadas por células o en una inmune humoral. La regulación de la activación de la célula T por citoquinas antiinflamatorias es un elemento control crucial temprano en este proceso (Figura 4).

al., 1992) al igual que IL-13 (De Waal Malefyt *et al.*, 1995). Es por esta razón que la definición convencional de células Th1 y Th2 depende estrictamente de la secreción de IFN- γ o IL-4. En consecuencia, la subpoblación Th1 secreta IFN- γ pero no IL-4, mientras que el subtipo Th2 secreta IL-4 pero no IFN- γ (Spellberg y Edwards, 2001).

La inhibición mutua entre las respuestas tipo Th1 y Th2 polariza el tipo de respuesta final frente a un patógeno determinado, siendo la regulación de las células T a partir de citoquinas anti inflamatorias un evento crucial en esta diferenciación (Opal y DePalo, 2000).

Existen fuertes mecanismos de retroalimentación negativa mediante el cual IL-4, STAT6, GATA3 y Maf actúan para mantener el fenotipo Th2 de células T diferenciadas y para regular negativamente la expresión de citoquinas Th1. La IL-4 ha sido conocida para regular negativamente la producción de IFN- γ , y este efecto parece estar mediado a través de los productos del gen objetivo STAT6, GATA3 y Maf. La expresión ectópica de GATA-3 o Maf, incluso en células T vírgenes deficientes de IL-4, resulta en una marcada inhibición de la producción de IFN- γ por células Th1 (Rao y Avni, 2000). Un área actual de intensa investigación es la capacidad de los patógenos para inducir selectivamente células dendríticas y que éstas, a su vez, induzcan a células T inocentes a convertirse en células Th1 o Th2; sin embargo, aún se sabe poco sobre los acontecimientos a nivel molecular (de Jong *et al.*, 2002).

Es así que el IFN- γ secretado por los linfocitos Th1 promueve una mayor diferenciación Th1 e inhibe la generación de linfocitos Th2 y Th17. De forma análoga, la IL-4 producida por los linfocitos Th2 promueve la diferenciación Th2 y la IL-21 producida por los linfocitos Th17 potencia la diferenciación Th17 (Abbas *et al.*, 2012). Asimismo, la diferenciación de cada subgrupo es inducida por el estímulo antigénico o microorganismo patógeno. Por esta razón, el desarrollo de linfocitos Th1 a partir de linfocitos T estimulados está dirigido por microorganismos intracelulares. Por el contrario, el sistema inmunitario responde a organismos extracelulares y parásitos helmintos mediante el desarrollo de linfocitos Th2, mientras que las respuestas Th17 las inducen algunas bacterias y hongos, las que son las más eficaces en la defensa contra estos microorganismos. La generación y funciones efectoras de estos linfocitos T diferenciados ilustran de forma excelente el concepto de la *especialización de la*

inmunidad adaptativa (Abbas *et al.*, 2012), la que hace referencia a la capacidad del sistema inmunitario de responder a diferentes microorganismos de las formas óptimas para combatirlos.

Además, los linfocitos T efectores diferenciados pueden responder a antígenos presentados por células diferentes a las células dendríticas. En las respuestas inmunitarias humorales, los linfocitos B presentan los antígenos a los linfocitos T cooperadores y son los receptores de las señales activadoras procedentes de las células cooperadoras. En las respuestas inmunitarias celulares, los macrófagos presentan los antígenos a los linfocitos T y éstos responden; y casi todas las células nucleadas pueden presentar el antígeno a los linfocitos T citotóxicos y sufrir su efecto lítico. Los linfocitos T de memoria que se generan tras la activación del linfocito T pertenecen a la reserva de linfocitos recirculantes y abundan en los tejidos mucosos y en la piel, así como en los órganos linfáticos. Estas células de memoria responden con rapidez al posterior encuentro con el antígeno y generan células efectoras nuevas que ayudarán a eliminar al antígeno (Abbas *et al.*, 2012).

Finalmente, las respuestas de los linfocitos T declinan después de la eliminación del antígeno por las células efectoras, proceso que devuelve el estado de equilibrio u homeostasis al sistema inmunitario producto de la apoptosis desencadenada por la privación de los estímulos para la supervivencia, los cuales son proporcionados normalmente por el antígeno, los coestimuladores y las citoquinas producidas durante las reacciones inflamatorias al antígeno. Se calcula que más del 90% de los linfocitos T específicos que surgen por la expansión clonal mueren por apoptosis a medida que se elimina el antígeno (Abbas *et al.*, 2012). No obstante, esta supresión de la respuesta inmunitaria, además del mantenimiento de la autotolerancia, es dada por los linfocitos T reguladores, los cuales dependen de las citoquinas TGF- β e IL-2 y la coestimulación por la vía B7:CD28 (Abbas *et al.*, 2008). La IL-2 promueve la diferenciación de los linfocitos T en el subgrupo regulador y también es necesaria para la supervivencia y el mantenimiento de esta población celular, ya que activa el factor de transcripción STAT5 que puede potenciar la expresión de FoxP3 (Abbas *et al.*, 2012). Un mecanismo mediante el cual estos linfocitos controlan las respuestas inmunitarias es mediante la secreción de citoquinas inmunosupresoras como IL-10 y TGF- β , que suprimen las respuestas inmunitarias al inhibir la activación del linfocito T y la fase efectora de estas

respuestas en los tejidos. Asimismo, inhiben la capacidad de estimulación de los linfocitos T por las células dendríticas a través de la expresión del CTLA-4 que se expresa en las células reguladoras FoxP3⁺ mediante la unión a las moléculas B7 situadas en la superficie de las CPA, lo que conlleva a su bloqueo o eliminación al interiorizarlas, dando lugar a una menor disponibilidad de B7 y a una incapacidad de proporcionar una estimulación adecuada para las respuestas inmunitarias (Abbas *et al.*, 2012).

Es importante señalar que la IL-2 es necesaria para la supervivencia y función de los linfocitos T reguladores, células encargadas de suprimir las respuestas inmunitarias contra antígenos propios y otros antígenos. De hecho, los ratones con genes inactivados que carecen de IL-2 o de su receptor para la IL-2 presentan una proliferación descontrolada de los linfocitos T y B, y una enfermedad autoinmune debida a un defecto en los linfocitos T reguladores. Estos estudios indican que otros factores de crecimiento pueden reemplazar a la IL-2 en la expansión de los linfocitos T efectoras, pero que ninguna otra citoquina puede sustituir a la IL-2 en el mantenimiento de los linfocitos T reguladores funcionales. Una característica interesante de esta función de la IL-2 es que los linfocitos T reguladores no producen cantidades significativas de la citoquina, lo que implica que dependen para su supervivencia de la IL-2 producida por otros linfocitos T que responden a antígenos extraños (Abbas *et al.*, 2012).

III. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. Lugar de estudio

El presente estudio se desarrolló en la Estación Experimental del Instituto Veterinario de Investigaciones Tropicales y de Altura (IVITA), ubicada en el distrito de Maranganí, provincia de Canchis, departamento de Cusco, Perú, y en las instalaciones del Laboratorio de Microbiología y Parasitología Veterinaria, sección Inmunología, de la Facultad de Medicina Veterinaria de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos (UNMSM), ubicado en el distrito de San Borja, ciudad de Lima metropolitana, provincia de Lima, departamento de Lima, Perú.

3.2. Animales y tamaño muestral

Es importante mencionar que el presente estudio fue desarrollado a partir del análisis de muestras intestinales criogenizadas en nitrógeno líquido a -196°C en los meses de setiembre del 2014 a junio del 2015. Estas muestras fueron tomadas en enero y febrero del 2014 por el responsable del Proyecto N° 180-FINCyT-IB-2013 “Respuesta inmune de mucosas de las crías de alpaca frente a *Clostridium perfringens*: caracterización molecular y su estimulación por inmunógenos orales para prevenir la enterotoxemia”, el Mg. MV. Alberto Manchego, quien estableció a criterio personal los parámetros del diseño experimental del presente trabajo en base a estudios previos, con la participación de tesis de pre y posgrado, y alumnos colaboradores. Las muestras provinieron de 20 crías clínicamente sanas, sin distinción de raza y sexo, de las comunidades de Silli y La Raya Cusco, criadas bajo un régimen extensivo con consumo de pasto natural donde permanecen junto a sus madres (Cuadro A.1). Las muestras fueron distribuidas en tres

grupos etarios. Se empleó como grupo control calibrador al conformado por dos fetos de alpaca de 11 meses de gestación (Cuadro A.2):

- Grupo control: 2 fetos (0 días de edad, 11 meses de gestación)
- Grupo 1: 1 a 8 días
- Grupo 2: 10 a 21 días
- Grupo 3: 22 a 47 días

Por otra parte, es también importante mencionar que el Comité de Ética y Bienestar Animal de la Facultad de Medicina Veterinaria de la UNMSM evaluó y aceptó el protocolo de eutanasia presentado por el responsable del Proyecto N° 180-FINCyT-IB-2013, previo a la ejecución del mismo. Dado que no existen referencias acerca del uso de fármacos para la eutanasia en alpacas, se empleó la metodología descrita por Swindle (1998). Se utilizó una combinación de los anestésicos Ketamina (20 mg/kg IM) y clorhidrato de Xylacina (2 mg/kg IM) y luego se aplicó una sobredosis de pentobarbital sódico (70 mg/Kg IV) a fin de producir un paro cardiorrespiratorio en los animales. Se comprobaron los signos vitales para confirmar el deceso de las alpacas y así proceder con la toma de muestras.

La toma de muestras se desarrolló en la Estación IVITA Marangani (Cusco, Perú) y el procesamiento de las mismas, en el Laboratorio de Microbiología y Parasitología Veterinaria, sección Inmunología, de la Facultad de Medicina Veterinaria UNMSM (Lima, Perú).

3.3. Obtención y procesamiento de las muestras

Como fue previamente mencionado, las muestras fueron colectadas durante las necropsias de los animales. Se tomaron muestras de 4 cm de longitud del segmento medio del yeyuno de forma aséptica. Los segmentos fueron inmediatamente lavados con suero fisiológico estéril 0.9% a fin de eliminar restos de contenido intestinal potencialmente inhibidores de las técnicas moleculares. Seguidamente, fueron colocados en crioviales estériles de 2 ml de capacidad, rotulados y congelados en nitrógeno líquido (-196°C) para su transporte hacia el Laboratorio de Microbiología y

Parasitología Veterinaria, sección Inmunología, de la Facultad de Medicina Veterinaria de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos.

3.4. Extracción del ARN total

Para el proceso de estandarización de la técnica de extracción de ARN se empleó muestras de secciones de intestino delgado de bovinos, las que fueron obtenidas y almacenadas en las mismas condiciones que las muestras diana. El proceso se detalla a continuación.

3.4.1. Etapa de separación con Trizol® Reagent

Los viales conteniendo las muestras fueron retirados del tanque de nitrógeno líquido y se cortó una porción de cada muestra de 150 mg en promedio, las que fueron pesadas en una balanza debidamente calibrada. Seguidamente, cada muestra fue colocada en un mortero estéril y pulverizada en nitrógeno líquido empleando un pilón estéril, evitando que se descongele. Al polvo formado se le agregó 2 ml de Trizol® Reagent y se homogenizó ligeramente por pipeteo, para luego ser transferido 1 ml a un microtubo de 2 ml e incubado a temperatura ambiente por 5 min. Transcurridos los 5 min, se agregó 200 µl de cloroformo (por cada 1 ml de Trizol) y se agitó el microtubo manualmente por 15 segundos. Los microtubos fueron incubados a temperatura ambiente por 2-3 min y centrifugados a 12000 g por 15 min a 4°C. Después de la centrifugación se observó 3 fases: una inferior, en la que se encuentra la mezcla de fenol y el cloroformo, una intermedia, y una superior o fase acuosa, la que contiene el ARN total extraído. El volumen de la fase superior acuosa fue de 400 µl aproximadamente. Esta fase acuosa fue transferida a un tubo nuevo de 2 ml, se adicionó un volumen igual de 400 µl de etanol 70% (obtención de una concentración final de 35%) y mezcló por vórtex. Finalmente, los tubos fueron agitados manualmente dispersando algún precipitado visible que pudo haberse formado.

Esta técnica se fundamenta en el método de extracción por fenol-cloroformo-isotiocianato de guanidina para la lisis de las membranas celulares, separando la muestra en una fase acuosa (conteniendo el ARN en cloroformo) y otra orgánica

(conteniendo el ADN y restos de proteínas desnaturalizadas), a su vez que mantiene la integridad del ARN debido a la inhibición altamente eficaz de la actividad ARNasa mientras lisa las células y disuelve los componentes celulares durante la homogenización de la muestra.

3.4.2. Captura del ARN

Se transfirió 700 µl de cada una de las muestras de la etapa anterior a un cartucho nuevo del kit PureLink™ Micro-to-Midi, insertado en un tubo de colección. Estos cartuchos fueron centrifugados a 12000 g por 15 segundos a temperatura ambiente, se descargó el fluido de los tubos de colección y se reinsertaron los cartuchos en los tubos. Se repitió el procedimiento descrito hasta que las muestras fueron procesadas en su totalidad.

3.4.3. Tratamiento con DNAsa I

Se adicionó 350 µl de buffer de lavado I a cada uno de los cartuchos insertados, los que fueron centrifugados a 12000 g por 15 segundos a temperatura ambiente, y se procedió a descartar los fluidos y los tubos de colección. Previamente, se preparó la DNAsa I (amplification grade) en buffer de DNAsa, teniendo en cuenta que este buffer DNAsa debe ser preparado a una concentración de 1x debido a que el comercial adquirido se encuentra a 10x. Es decir, en un microtubo se diluyó 10 µl de DNAsa I en 70 µl de buffer de DNAsa y se mezcló por inversión. Se preparó el volumen total de DNAsa I considerando el número de muestras a analizar para cada mix. Seguidamente, se agregó 80 µl del preparado a cada cartucho de extracción de ARN, colocándolo directamente a la membrana de sílica. Los cartuchos fueron incubados a temperatura ambiente por 15 min. Luego se adicionó 350 µl del buffer de lavado I a cada cartucho de extracción, los que fueron centrifugados a 12000 g por 15 segundos a temperatura ambiente para, finalmente, descartar los fluidos.

3.4.4. Lavado y recuperación del ARN

Se adicionó 350 µl del buffer de lavado I al cartucho de extracción y se centrifugó a 12000 g a temperatura ambiente por 15 segundos. Seguidamente se descartó el fluido y

el tubo de colección. Se colocó el cartucho en un tubo de lavado nuevo (provisto por el kit) y se adicionó 500 µl del buffer de lavado II (preparado con etanol) al cartucho de extracción. Se procedió a centrifugar a 12000 g por 15 segundos a temperatura ambiente, descartándose el fluido y reinsertando el cartucho al tubo de colección. Se repitió el procedimiento por segunda vez. Se volvió a centrifugar a 12000 g por 1 min a temperatura ambiente a fin de secar la membrana de sílica con el ARN capturado. Se descartó el tubo de colección e insertó el cartucho de extracción a un tubo de recuperación de ARN (suplementado por el kit). Se agregó 100 µl de agua libre de nucleasas directamente a la membrana de sílica para recuperar el ARN. Seguidamente, se centrifugó el cartucho por 2 min a 12000 g a temperatura ambiente y se procedió a alicuotar en tres tubos de 600 µl (alícuotas de 25 µl, en total 4 viales). Finalmente, se evaluó la calidad y cantidad del ARN extraído. Los tubos fueron almacenados a -70°C.

3.5. Cuantificación del ARN

Se empleó el Qubit® fluorometer. Para tal efecto, se preparó el buffer de cuantificación (*Quant-iT™ RNA working solution*) diluyendo el Quant-iT™ reagent 1:200 en el buffer Quant-iT™. El volumen de preparado se basó en la multiplicación de los volúmenes por el número de muestras a analizar. Se recomienda preparar mínimo para 10 mediciones (incluyendo los dos estándares de cuantificación).

Para la preparación de los estándares (0 ng/ml y 10 ng/ml), se colocó 190 µl del buffer de cuantificación en dos tubos de 500 µl para lecturas en Qubit® fluorometer. Se agregó 10 µl del estándar #1 (0 ng/ml) a uno de los tubos, y 10 µl del estándar #2 (10 ng/ml) al otro tubo.

Para la preparación de las muestras, se transfirió 198 µl (entre 180 a 199 µl) de buffer de cuantificación a tubos de 500 µl para lecturas en el *Qubit® fluorometer*. Se agregó 2 µl (entre 1 a 20 µl) de muestra de ARN. Se agitaron los tubos por vórtex por 2 a 3 segundos y luego fueron incubados por 2 min a temperatura ambiente.

Finalmente, se calibró el fluorómetro Qubit® usando los estándares #1 y #2, y se realizó la lectura de las muestras en el mismo. Este proceso fue repetido por triplicado. A fin de determinar la concentración original de la muestra, se multiplicó el valor dado por el factor de dilución de las muestras. De forma alternativa, se eligió el cálculo del

equipo con la opción “*calculate sample concentration*”. Se anotaron los valores obtenidos (Cuadro A.3).

3.6. Electroforesis de ARN en gel desnaturalizante: estimación de la calidad del ARN

Con la finalidad de estimar la calidad del ARN extraído, se desarrolló una electroforesis de ARN en gel desnaturalizante.

3.6.1. Preparación del gel

A fin de preparar 100 ml de gel de agarosa al 1%, se pesó 1 g de agarosa y se mezcló en 100 ml de buffer TBE (Tris, Borato y EDTA) o en TAE (Tris, Acetato y EDTA). Se agregó 1.5 ml de hipoclorito de sodio (lejía Clorox® 4%) y mezcló por agitación. Se incubó por 5 min a temperatura ambiente. Seguidamente, se calentó la suspensión para disolver la agarosa y se dejó enfriar. Luego se preparó la cubeta y vertió la agarosa, se colocó los peines y se dejó solidificar. Finalmente, se agregó el buffer de corrida en volumen suficiente para cubrir completamente el gel de agarosa.

3.6.2. Preparación de buffer de carga

Se colocó 1.2 µl de bromuro de etidio en microtubos de 0.6 ml. Se preparó un vial para cada muestra y marcador de peso molecular. Se agregó 2 µl de buffer de carga (bromofenol, xilencianol y tartrazina). De cada una de las muestras de ARN, se tomó 5 µl y se mezcló con el buffer de carga y bromuro de etidio, pipeteando ligeramente. Se procedió de la misma manera para el marcador de peso molecular. Se cargó la mezcla de cada una de las muestras al gel preparado. Se colocó la cubierta y los cables conectados a la fuente de poder. Se programó a 90V por 1 hora y, finalmente, se visualizó las bandas en el transiluminador UV.

3.7. Síntesis de ADN complementario (ADNc) o Transcripción inversa

El ARN obtenido de cada una de las muestras fue tomado como templado para la síntesis del ADNc (ADN complementario), proceso denominado “transcripción inversa” (RT, *reverse transcription*), utilizándose el kit *SuperScript™ III First-Strand Synthesis SuperMix for qRT-PCR* (Invitrogen™, USA). El material empleado fue original, nuevo y libre de nucleasas. Adicionalmente, el ambiente de trabajo y materiales de laboratorio (pipetas, gradillas y demás materiales plásticos no perecibles) fueron irradiados con luz ultravioleta por un tiempo mínimo de 12 horas previas a su uso.

El kit *SuperScript™ III First-Strand Synthesis SuperMix for qRT-PCR* (Invitrogen™, USA) es una versión del M-MLV RT (Murine Leukemia Virus) que ha sido diseñado para reducir la actividad RNasa H y proporcionar una mayor estabilidad térmica. La enzima puede utilizarse para sintetizar ADNc en un rango de temperatura de 42-60°C, proporcionando una mayor especificidad, mayores rendimientos de ADNc y más producto de longitud completa que otras retrotranscriptasas. Debido a que *SuperScript™ III RT* no es inhibido significativamente por los ARN ribosomal (ARNr) y de transferencia (ARNt), puede ser utilizado para sintetizar ADNc a partir del ARN total (Life Technologies Corporation, 2006). Contiene 3 componentes fundamentales: 1) RNaseOUT™ inhibidor recombinante de la ribonucleasa incluido en la mezcla de enzimas, es una proteína inhibidora de RNasa que protege contra la degradación del ARN diana debido a la contaminación de la ribonucleasa en la preparación del ARN; 2) la mezcla de la reacción 2X RT, la que incluye los oligonucleótidos u oligo(dT)₂₀ 2.5 µM, hexámeros al azar (2.5 ng/µl), MgCl₂ 10 mM y los dNTPs en un tampón o buffer de formulación que ha sido optimizado para la RT-PCR cuantitativa y 3) la RNasa H de *E. coli*.

Los componentes de la reacción se prepararon como premezcla de síntesis (*Master Mix*, mix de reacción) de ADNc en tubos eppendorf de 2 ml de capacidad nuevos y libres de nucleasas, previamente tratados mediante esterilización húmeda (autoclavado) por tres veces, teniendo en cuenta el número de muestras y el volumen final de reacción. Esta premezcla se mantuvo en hielo durante su preparación y antes de su uso a fin de prevenir el inicio de la reacción a temperatura ambiente. Los componentes del mix de

reacción para un volumen final de 20 μl por muestra fueron agregados en el siguiente orden y volumen:

2X RT Reaction Mix	10 μl x n
RT Enzyme Mix	2 μl x n
Hexámeros al azar	1 μl x n
DEPC – treated water (agua libre de nucleasas)	5 μl x n

Donde “n” significa el número de muestras a trabajar.

La cantidad de ADNc que se sintetizó fue de 20 μl por muestra. Por lo tanto, se empleó 2 μl de ARN de cada muestra y 18 μl de Master Mix. El Master Mix preparado para un volumen final de reacción de 20 μl fue el siguiente (Cuadro 2):

Cuadro 2. Master Mix para la síntesis de 20 μl de ADNc a partir de ARN total

Solución	Proporción		Cantidad a preparar (μl)	Cantidad a utilizar (μl)	Sobrante (μl)	Cantidad suministrada por muestra
	Factor	Nº muestras				
2X RT Reaction mix	10 μl	23*	230	220	10	18 μl por cada muestra (22)
H ₂ O ultra-purificada con DEPC	5 μl	23	115	110	5	
MuLV (Murine leukemia virus)	2 μl	23	46	44	2	
Hexámeros al azar	1 μl	23	23	22	1	
Total			414	396	18	

* Se hace el cálculo para 23 muestras en vez de 22 con la finalidad de que todas las muestras reciban 18 μl exactos de Master Mix, ya que el exceso o sobrante es menor a 18 μl , cantidad insuficiente para ser utilizada en una vigésimo tercera muestra. A partir de 15 muestras, el preparado de Master Mix se calcula para el total de muestras más uno (total de muestras + 1).

Se dispensó 18 μl de Master Mix en tubos descartables individuales con tapa incorporada para termociclador de 200 μl de capacidad. Seguidamente, se añadió 2 μl de ARN templado de cada una de las muestras en los tubos correspondientes, lo que representa el 10% del volumen final de la reacción como lo indica el fabricante; además de la muestra “blanco” o “calibrador” conformada por agua libre de nucleasas. Previamente, los ARN fueron descongelados y mantenidos en hielo. Las muestras se colocaron en el termociclador PTC 200 (*Peltier therme cyclers* 200) Chromo 4 (detector continuo de fluorescencia) (MJ Research – Biorad, USA), programado con el siguiente protocolo por ciclo: a) incubación a 25°C por 10 min (extensión de cebadores), b) incubación a 50°C por 30 min (síntesis de ADNc), c) incubación a 85°C por 5 min

(término de la reacción al inactivar la transcriptasa inversa) y d) incubación a 14°C indefinidamente para mantener la muestra. El ADN complementario obtenido fue congelado a -70°C hasta su uso posterior en la reacción de PCR a tiempo real.

3.8. PCR a tiempo real para los genes de GAPDH, IFN- γ , TNF- α , IL-2, IL-12, T-bet, STAT-1 y STAT-4

Se emplearon los oligonucleótidos diseñados en el Laboratorio de Microbiología y Parasitología Veterinaria, sección Inmunología, mediante el programa *Primer3*: *WWW primer tool* (University of Massachussets, USA) (Cuadro 3), para la amplificación específica de los genes de las citoquinas y factores transcripcionales involucrados en la activación y diferenciación del linfocito Th1, y del gen del gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH), empleado como control endógeno para la normalización de la qRT-PCR (*quantitative Reverse Transcriptase – Polymerase Chain Reaction*, PCR cuantitativa a tiempo real con transcripción inversa).

Cuadro 3. Oligonucleótidos empleados para la PCR tiempo real cuantitativa de GAPDH y las citoquinas y factores transcripcionales involucrados en el perfil Th1 en alpacas

Gen	Longitud (bp) ¹	Secuencia de los oligonucleótidos ²	Ta o Th ³ (°C)	NCBI reference sequence
GAPDH	201	F: ATCACTGCCACCCAGAAGAC R: GCACGTCAGATCCACAACAG	60.12 60.32	XM_006210852
T-bet	208	F: TTCCAATGCGCACATCTTTA R: GTAGTGATCTCCCCCAAGCA	60.22 60.07	XM_006220183.1
STAT-1	224	F: GGAAAATGCCAGAGATTCA R: CATTCTTTGCCACACCATG	60.00 60.00	XM_006207285.1
IFN- γ	152	F: GATCATTCAAAGGAGCATGGA R: TGACKTCTCTTCCGCTTTCT ³	56.00 59.04	XM_006199060.1
STAT-4	206	F: TCTTCCCCTTTGGATTGATG R: ACAACCGGCCTTTGTTGTAG	59.86 60.03	XM_006207286.1
IL-12	199	F: TGGTGGGAAGCTGTTCAACAAG R: ACCTGCACACAAAACGTCAG	59.87 59.79	XM_006211899.1
IL-2	211	F: TGCAAYTCTTGTCTTGCATTG ³ R: TGCAAYTCTTGTCTTGCATTG ³	57.64 57.40	XM_006217618.1
TNF- α	207	F: CMGTCTCCTACCCAAACAAA ⁴ R: CGAAGTAGACCTGCCAGAC	59.96 59.87	XM_006215316.1

¹ bp: longitud del producto expresada en pares de bases

² Los iniciadores se expresan como F (cebador de avance) y R (cebador de regreso)

³ Ta o Th: Temperatura de alineamiento “*annealing*” o hibridación

El diseño de oligonucleótidos empleados fue basado en las secuencias nucleotídicas de los ARN mensajeros disponibles en el GenBank, base de datos de las secuencias genéticas de los Institutos Nacionales de Salud (NIH, National Institutes of Health) de Estados Unidos. El GenBank, a través del National Center for Biotechnology Information (NCBI), forma parte del International Nucleotide Sequence Database Collaboration, el cual comprende también al DNA DataBank de Japón (DDBJ) y el European Molecular Biology Laboratory (EMBL).

Se utilizó el ADNc de cada una de las muestras como templado para la reacción de PCR tiempo real cuantitativa empleando el kit *SYBR® GreenER™ qPCR SuperMix Universal* (Invitrogen™, USA), siguiendo las instrucciones del fabricante. El kit contiene una versión de la *hot-start* polimerasa *Taq* DNA con la uracilo DNA glicosilasa (UDG, *uracil DNA glycosylase*) integrada, SYBR® GreenER™ (agente intercalante fluorescente), MgCl₂, dNTPs (con dUTP en vez de dTTP), y estabilizadores. La UDG y los dUTP en el SuperMix previenen la reamplificación de los productos de PCR sobrantes o arrastrados entre reacciones. El dUTP asegura que ningún DNA amplificado contendrá uracilo, mientras que la UDG remueve los residuos de uracilo de las cadenas simples y dobles del DNA. Esta UDG es luego inactivada por las altas temperaturas durante los ciclos normales de la PCR, permitiendo así la amplificación de secuencias dianas genuinas (Life Technologies Corporation, 2010).

Previamente, los oligonucleótidos fueron diluidos en agua libre de nucleasas para obtener soluciones de trabajo de 10 µM, a fin de que su concentración final en la reacción sea de 0.2 µM en todos los casos. Al igual que en la fase anterior, el material empleado también fue nuevo y libre de nucleasas; los materiales plásticos no perecibles y el ambiente de trabajo fueron irradiados con luz ultravioleta previamente a su utilización.

Los Master Mix fueron preparados en tubos eppendorf de 2 ml de capacidad nuevos y libres de nucleasas. Los componentes fueron agregados en el siguiente orden y concentración para un volumen final de 25 µl por muestra (23 µl de Master Mix y 2 µl de cDNA):

Master Mix	SYBR Green Master Mix	12.5 µl x n	23.0 µl
	Primer Forward (10 µM)	0.5 µl x n	
	Primer Reverse (10 µM)	0.5 µl x n	
	ROX (1:10)	0.5 µl x n	
	Agua libre de nucleasas	9.0 µl x n	
cDNA	-----	-----	2.0 µl
Volumen final			25.0µl

Donde “n” significa el número de muestras a trabajar.

En general, la relación entre la cantidad de ADN por muestra y Master Mix es de 1:10. Sin embargo, según el protocolo estandarizado del Laboratorio de Microbiología y Parasitología Veterinaria, sección Inmunología, los volúmenes totales de Master Mix y cDNA empleados fue de 23 y 2 µl, respectivamente, con un volumen final de reacción de 25 µl (Cuadro 4).

Cuadro 4. Master Mix empleado en las PCR tiempo real de los genes en estudio

Solución	Proporción		Cantidad a preparar (µl)	Cantidad suministrada por muestra
	Factor	N° muestras		
Master Mix SYBR green	12.5 µl	23*	287.5	23 µl por cada muestra (22)
Primer Forward	0.5 µl	23	11.5	
Primer Reverse	0.5 µl	23	11.5	
Rox (1:10)	0.5 µl	23	11.5	
H ₂ O libre de nucleasas	9.0 µl	23	207	
Total			529	

* Se hace el cálculo para 23 muestras en vez de 22 con la finalidad de que todas las muestras reciban 23 µl exactos de Master Mix, ya que el exceso o sobrante es menor a 23 µl, cantidad insuficiente para ser utilizada en una vigésimo tercera muestra. A partir de 15 muestras, el preparado de Master Mix se calcula para el total de muestras más uno (total de muestras + 1).

Se procedió a dar un ligero vórtex de 3 segundos para homogenizar el Mater Mix. Se colocó 23 µl del Master mix en los microtubos de 200 µl y se adicionó 2 µl de ADNc templado de cada una de las muestras en cada uno. Seguidamente, los microtubos fueron colocados en el termociclador Applied Biosystems® 7500 Real-Time PCR System (Life Technologies, USA).

Por orden lógico de ejecución, el primer RT-PCR desarrollado correspondió al gen *housekeeping* GAPDH a fin de demostrar la presencia de células viables capaces de expresar los genes de las citoquinas y factores de transcripción evaluados. GAPDH fue

utilizado como control endógeno en la cuantificación relativa de los amplicones producidos por estas citoquinas y factores. Posteriormente, se desarrollaron las RT-PCR para las citoquinas IFN- γ , TNF- α , IL-2 e IL-12, y para los factores de transcripción T-bet, STAT-1 y STAT-4. Las condiciones de la PCR a tiempo real para todos los genes fueron las siguientes: 50°C por 2 min (incubación con UDG), 95°C por 10 min (inactivación del UDG y activación de la ADN polimerasa), seguido de 45 ciclos de 95°C por 15 segundos y 60°C por 60 segundos (Cuadro 5), curva de disociación de 65°C hasta 95°C con lectura de placa cada 0.3°C cada 2 segundos, e incubación indefinida a 14°C para mantener los productos de PCR. Una vez finalizado el proceso (stop), los tubos fueron retirados del termociclador y refrigerados a 4°C.

Cuadro 5. Protocolo de las PCRs en tiempo real en el termociclador Applied Biosystems® 7500 Real-Time PCR System (Life Technologies, USA)

Incubación con UDG	Activación de la polimerasa	Ciclo (45 ciclos)	
50°C por 2 min	95°C por 10 min	Denaturación 95°C por 15 segundos	Hibridación y Extensión 60°C por 60 segundos

Los resultados fueron visualizados a través del *software 7500 'For 7500 and 7500 Fast Real Time PCR Systems' versión 2.0.6* (Life Technologies, USA), obteniéndose los valores de Ct (*cycle threshold*, ciclo umbral) y temperaturas de disociación (T_m, *melting temperature*) de cada uno de los productos de PCR. La fluorescencia emitida por los amplicones al finalizar cada ciclo (extensión) y empezar el siguiente (denaturación) es interpretada como “temperatura de melting o de disociación”. El ensayo fue desarrollado por triplicado a fin de obtener un promedio de Ct de cada una de las muestras para su posterior cuantificación relativa.

3.9. Cuantificación relativa

La cuantificación relativa de las citoquinas IFN- γ , TNF- α , IL-2 e IL-12 y factores transcripcionales T-bet, STAT-1 y STAT-4, se realizó con el Método $2^{-\Delta\Delta Ct}$ o Método del C_T comparativo (Livak y Schmittgen, 2001), el que se basa en el análisis comparativo de los C_T (*cycle threshold* o ciclo umbral) de los genes diana respecto al los C_T de un gen control (gen endógeno, *housekeeping gene*) en las muestras (Tiempo X) y

calibradores (Tiempo 0). El gen endógeno empleado fue el del gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH) y el grupo control-calibrador, el conformado por los fetos de alpaca.

$$NRQ = 2^{-\Delta\Delta Ct} = 2^{(-\Delta\Delta Ct)}$$

Donde:

NRQ : Normalised Relative Quantity (cantidad relativa del gen diana respecto al calibrador)

$\Delta\Delta Ct$: $\Delta Ct \text{ test} - \Delta Ct \text{ calibrador} =$
 $(C_{T \text{ target}} - C_{T \text{ control}})_{\text{Tiempo } x} - (C_{T \text{ target}} - C_{T \text{ control}})_{\text{tiempo } 0}$
 Diferencia entre los ARNm del control endógeno y de la muestra respecto al calibrador

$\Delta Ct \text{ test}$: $Ct (\text{target, test}) - Ct (\text{ref, test})$

$\Delta Ct \text{ calibrador}$: $Ct (\text{target, cal}) - Ct (\text{ref, cal})$

En este método los resultados son presentados como “cantidad en [número de veces] del gen diana expresado respecto a un calibrador”.

3.10. Análisis de la información

Los valores de Ct (*cycle threshold*, ciclo umbral) y Tm (temperatura de melting o disociación) de los productos del RT-PCR fueron introducidos en una plantilla de Excel. Se calcularon los valores promedio de Ct para cada gen endógeno, citoquina y factor de transcripción, a partir de los que se estimó la media aritmética, la varianza, la desviación estándar (SD) y el coeficiente de variación (CV).

Se empleó el software estadístico STATA SE 10.1 para el desarrollo de las pruebas no paramétricas de Kruskal Wallis y Comparación Múltiple de Medianas, a fin de determinar la existencia de diferencia estadística significativa en la expresión relativa de las citoquinas IFN- γ , TNF- α , IL-2 e IL-12, y los factores de transcripción T-bet, STAT-1 y STAT-4, en los tres grupos etarios evaluados. Paralelamente, se desarrolló un análisis de varianza de una sola vía (ANOVA), seguido del análisis *post hoc* correspondiente.

IV. RESULTADOS

4.1. Expresión del gen endógeno GAPDH

4.1.1. PCR con transcripción inversa en tiempo real

Se obtuvo valores de Ct desde 20.39 a 26.52, lo que evidencia una amplificación temprana del ADN en las muestras. Se encontró cuatro temperaturas de disociación en los productos (Figura A.1). El 36.36% (8/22) de las muestras presentó un producto de 86.24°C, el 31.81% (7/22), un producto de 86.39°C, el 18.18% (4/22), un producto de 86.41°C y el 13.64% (3/22) presentó un producto de 86.56°C (Cuadro 6).

4.2. Expresión del factor transcripcional STAT-1

4.2.1. PCR con transcripción inversa en tiempo real

Se obtuvo valores de Ct desde 20.94 a 25.31, lo que evidencia una amplificación temprana del ADN en las muestras. Se encontró cuatro temperaturas de disociación en los productos (Figura A.2). El 18.18% (4/22) de las muestras presentó un producto de 76.13°C, el 22.73% (5/22), un producto de 76.28°C, el 36.36% (8/22), un producto de 76.43°C y el 22.73% (5/22) presentó un producto de 76.58°C (Cuadro 6).

4.2.2. Cuantificación relativa y análisis estadístico

La cinética de expresión de STAT-1 fue positiva y proporcional a la edad ($p=0.2984$) (Figura A.9, Cuadro A.4). Se observó la máxima expresión de ARNm de STAT-1 de 5.99 lo expresado por el calibrador en el grupo conformado por animales de 22 a 47 días de edad, y la mínima expresión de 1.58 veces en el grupo etario menor (Figura 5).

4.3. Expresión del factor transcripcional T-bet

4.3.1. PCR con transcripción inversa en tiempo real

Se obtuvo valores de Ct desde 19.78 a 26.52, lo que evidencia una amplificación temprana del ADN en las muestras. Se encontró cuatro temperaturas de disociación en los productos (Figura A.3). El 9.09% (2/22) de las muestras presentó un producto de 80.35°C, el 27.27% (6/22), un producto de 80.5°C, el 36.36% (8/22), un producto de 80.65°C y el 27.27% (6/22) presentó un producto de 80.79°C (Cuadro 6).

4.3.2. Cuantificación relativa y análisis estadístico

La cinética de expresión de T-bet fue positiva y proporcional a la edad. Se observó la máxima expresión de ARNm de T-bet de 35.46 veces lo expresado por el calibrador en el grupo conformado por animales de 22 a 47 días de edad, una expresión de 4.76 en el grupo de 10-21 días de edad y la mínima expresión de 1.48 en el grupo etario de 1-8 días de edad (Figura 5). Se observó diferencia estadística significativa entre los grupos etarios de 1-8 y 10-21 días ($p=0.045$), 1-8 y 22-47 días ($p=0.0001$) y 10-21 y 22-47 días ($p=0.028$) (Figura A.10, Cuadro A.4).

4.4. Expresión de interferón gamma (IFN- γ)

4.4.1. PCR con transcripción inversa en tiempo real

Se obtuvo valores de Ct desde 22.83 a 34.65, lo que evidencia variabilidad en la amplificación del ADN en las muestras. Se encontró cuatro temperaturas de disociación en los productos (Figura A.4). El 18.18% (4/22) de las muestras presentó un producto de 76.78°C, otro 18.18% (4/22), un producto de 76.93°C, el 31.81% (7/22), un producto de 77.08°C y el 31.81% (7/22) restante presentó un producto de 77.23°C (Cuadro 6).

4.4.2. Cuantificación relativa y análisis estadístico

La cinética de expresión de IFN- γ fue positiva y proporcional a la edad. Se observó la máxima expresión de ARNm de IFN- γ de 117.18 veces lo expresado por el calibrador en el grupo conformado por animales de 22 a 47 días de edad, una expresión de 7.68 en el grupo de 10-21 días de edad y la mínima expresión de 2.24 en el grupo etario de 1-8 días de edad (Figura 5).

Las pruebas de Kruskal Wallis y comparación múltiple de medianas determinó diferencia estadística significativa entre los grupos etarios de 1-8 y 10-21 días ($p=0.045$) y 1-8 y 22-47 días ($p=0.0002$) (Figura A.11, Cuadro A.4).

4.5. Expresión del factor transcripcional STAT-4

4.5.1. PCR con transcripción inversa en tiempo real

Se obtuvo valores de Ct desde 23.16 a 29.89, lo que evidencia una amplificación temprana del ADN en las muestras. Se encontró siete temperaturas de disociación en los productos (Figura A.5). El 31.81% (7/22) de las muestras presentó un producto de 77.6°C, un 9.09% (2/22), un producto de 77.67°C, otro 9.09% (2/22), un producto de 77.74°C, el 22.73% (5/22), un producto de 77.77°C, el 4.55% (1/22), un producto de

77.89°C, el 18.18% (4/22), un producto de 77.92°C y el 4.55% (1/22) restante presentó un producto de 78.06°C (Cuadro 6).

4.5.2. Cuantificación relativa y análisis estadístico

La cinética de expresión de STAT-4 fue positiva y proporcional a la edad ($p=0.3255$) (Figura A.12, Cuadro A.4). Se observó la máxima expresión de ARNm de STAT-4 de 3.28 veces lo expresado por el calibrador en el grupo conformado por animales de 22 a 47 días de edad, una expresión de 1.84 en el grupo de 10-21 días de edad y la mínima expresión de 0.78 en el grupo etario de 1-8 días de edad (Figura 5).

4.6. Expresión de interleucina 12 (IL-12)

4.6.1. PCR con transcripción inversa en tiempo real

Se obtuvo valores de Ct desde 29.89 a 33.49, lo que evidencia variabilidad en la amplificación del ADN en las muestras. Se encontró cuatro temperaturas de disociación en los productos (Figura A.6). El 18.18% (4/22) de las muestras presentó un producto de 81.62°C, el 9.09% (2/22), un producto de 81.91°C, el 50% (11/22), un producto de 82.06°C y el 22.73% (5/22) presentó un producto de 82.21°C (Cuadro 6).

4.6.2. Cuantificación relativa y análisis estadístico

Se observó la máxima expresión de ARNm de IL-12 de 0.60 veces lo expresado por el calibrador en el grupo conformado por animales de 10 a 21 días de edad, una expresión de 0.45 en el grupo de 22-47 días de edad y la mínima expresión de 0.16 en el grupo etario de 1-8 días de edad ($p=0.1644$) (Figura 5, Figura A.13, Cuadro A.4).

4.7. Expresión de interleucina 2 (IL-2)

4.7.1. PCR con transcripción inversa en tiempo real

Se obtuvo valores de Ct desde 19.78 a 27.07, lo que evidencia variabilidad en la amplificación del ADN en las muestras. Se encontró cinco temperaturas de disociación en los productos (Figura A.7). El 5.55% (1/22) de las muestras presentó un producto de 77.71°C, otro 5.55% (1/22), un producto de 77.86°C, el 33.33% (6/22), un producto de 78.01°C, el 27.78% (5/22), un producto de 78.16°C y el 27.78% (5/22) restante presentó un producto de 78.31°C (Cuadro 6).

4.7.2. Cuantificación relativa y análisis estadístico

La cinética de expresión de IFN- γ fue positiva y proporcional a la edad. Se observó la máxima expresión de ARNm de IFN- γ de 26.52 veces lo expresado por el calibrador en el grupo conformado por animales de 22 a 47 días de edad, una expresión de 9.89 en el grupo de 10-21 días de edad y la mínima expresión de 2.7 en el grupo etario de 1-8 días de edad (Figura 5).

Las pruebas de Kruskal Wallis y comparación múltiple de medianas determinó diferencia estadística significativa entre los grupos etarios de 1-8 y 10-21 días ($p=0.0256$) y 1-8 y 22-47 días ($p=0.0012$) (Figura A.14, Cuadro A.4).

4.8. Expresión de factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α)

4.8.1. PCR con transcripción inversa en tiempo real

Se obtuvo valores de Ct desde 28.75 a 36.11, lo que evidencia variabilidad en la amplificación del ADN en las muestras. Se encontró cinco temperaturas de disociación en los productos (Figura A.8). El 9.09% (2/22) de las muestras presentó un producto de 83.75°C, el 18.18% (4/22), un producto de 83.97°C, el 27.27% (6/22), un producto de

84.04°C, el 13.64% (3/22), un producto de 84.12°C y el 31.82% (7/22) restante presentó un producto de 84.19°C (Cuadro 6).

4.8.2. Cuantificación relativa y análisis estadístico

La cinética de expresión de TNF- α fue positiva y proporcional a la edad. Se observó la máxima expresión de ARNm de TNF- α de 5.39 veces lo expresado por el calibrador en el grupo conformado por animales de 22 a 47 días de edad, una expresión de 1.53 en el grupo de 10-21 días de edad y la mínima expresión de 0.9 en el grupo etario de 1-8 días de edad (Figura 5). Se observó diferencia estadística significativa entre los grupos etarios de 1-8 y 22-47 días ($p=0.0007$) y 10-21 y 22-47 días ($p=0.035$) (Figura A.15, Cuadro A.4).

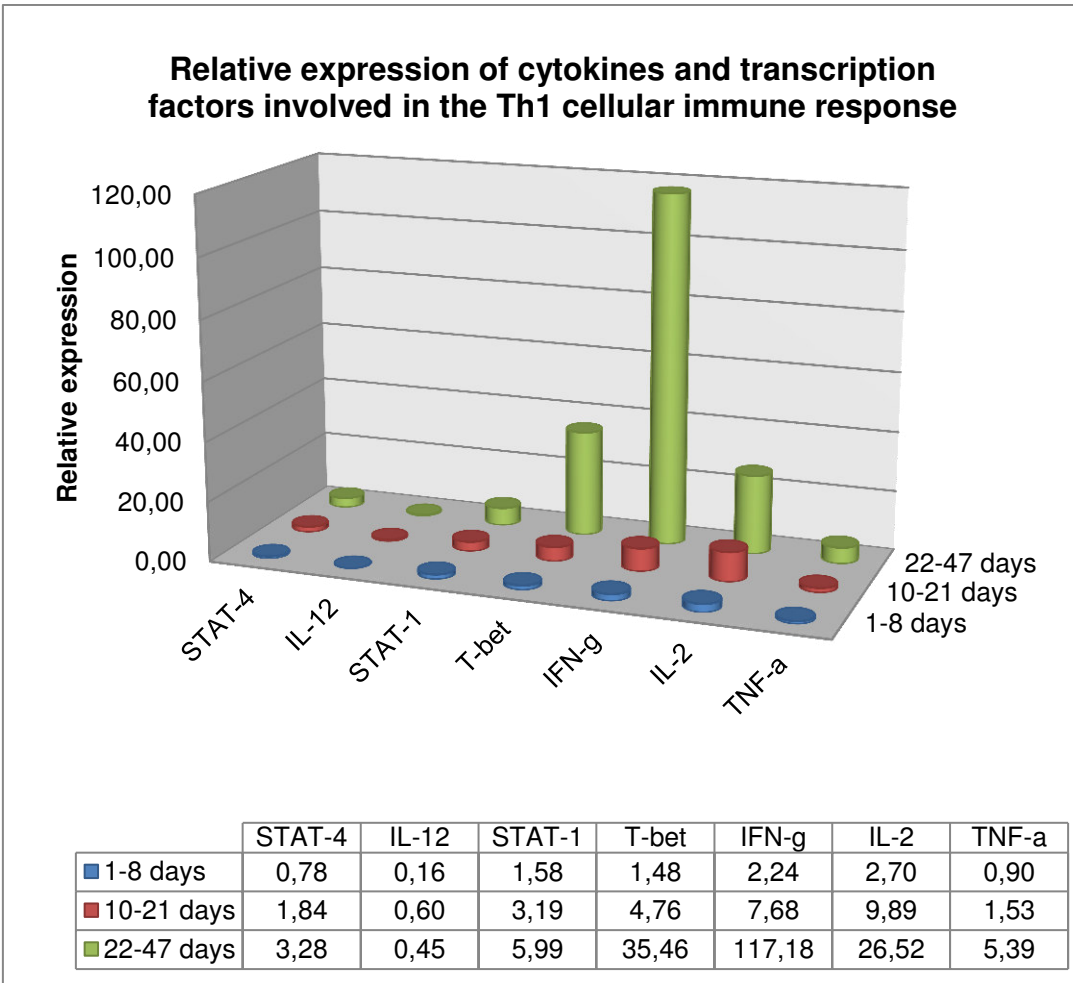


Figura 5. Expresión relativa de citoquinas y factores transcripcionales involucrados en la activación y diferenciación del linfocito Th1. Nótese la tendencia positiva respecto a la edad, a excepción de IL-12.

Cuadro 6. Temperaturas de disociación (Tm) de los productos de PCR de los genes en estudio

Gen	Tm (°C)	Frecuencia	Porcentaje (%)
GAPDH	86.24	8/22	36.36
	86.39	7/22	31.81
	86.41	4/22	18.18
	86.56	3/22	13.64
STAT-1	76.13	4/22	18.18
	76.28	5/22	22.73
	76.43	8/22	36.36
	76.58	5/22	22.73
T-bet	80.35	2/22	9.09
	80.50	6/22	27.27
	80.65	8/22	36.36
	80.79	6/22	27.27
IFN- γ	76.78	4/22	18.18
	76.93	4/22	18.18
	77.08	7/22	31.81
	77.23	7/22	31.81
STAT-4	77.60	7/22	31.81
	77.67	2/22	9.09
	77.74	2/22	9.09
	77.77	5/22	22.73
	77.89	1/22	4.55
	77.92	4/22	18.18
	78.06	1/22	4.55
IL-12	81.62	4/22	18.18
	81.91	2/22	9.09
	82.06	11/22	50
	82.21	5/22	22.73
IL-2	77.71	1/22	5.55
	77.86	1/22	5.55
	78.01	6/22	33.33
	78.16	5/22	27.78
	78.31	5/22	27.78
TNF-α	83.75	2/22	9.09
	83.97	4/22	18.18
	84.04	6/22	27.27
	84.12	3/22	13.64
	84.19	7/22	31.82

En resumen, el análisis de normalidad mediante la prueba de Shapiro-Wilk estableció que las variables no seguían una distribución normal. La prueba de Kruskal Wallis determinó diferencia estadística significativa en las expresiones relativas de T-bet, IFN- γ , IL-2 y TNF- α , mas no en STAT-1, STAT-4 e IL-12 (Figuras 6 y 7). El análisis de comparación múltiple de medianas sólo determinó diferencia estadística significativa, básicamente, entre los grupos de 1-8 días y 22-47 días de edad (Cuadro A.2, Figuras A.9-A.15).

El análisis de las cinéticas de las expresiones de T-bet e IFN- γ brindó significancia estadística en los tres grupos etarios. Respecto al factor transcripcional, los grupos de 1-8, 10-21 y 22-47 días de edad presentaron una expresión de 1.48, 4.76 y 35.46 veces lo expresado por el grupo calibrador (fetos), respectivamente. Las diferencias en las expresiones fueron estadísticamente significativas entre los grupos de 1-8 y 10-21 días ($p=0.045$), 1-8 y 22-47 días ($p=0.0001$) y 10-21 y 22-47 días ($p=0.029$). En cuanto a interferón gamma, los grupos de 1-8, 10-21 y 22-47 días de edad presentaron una expresión de 2.24, 7.68 y 117.18 veces lo expresado por el calibrador, respectivamente, encontrándose diferencias estadísticas significativas entre los grupos de 1-8 y 10-21 días ($p=0.045$) y 1-8 y 22-47 días ($p=0.0002$).

Respecto a la cuantificación relativa de los ARN mensajeros de IL-2, se observó una cinética directamente proporcional a la edad, siendo de 2.7, 9.89 y 26.52 veces lo expresado por el calibrador. Las diferencias en las expresiones fueron estadísticamente significativas entre los grupos etarios de 1-8 y 22-47 días ($p=0.025$), y entre el de 10-21 días y el de mayor edad ($p=0.001$). Asimismo, la expresión de TNF- α también mostró una tendencia creciente proporcional al grupo etario, siendo de 0.90, 1.53 y 5.39 veces lo expresado por el calibrador (fetos), existiendo sólo diferencia estadística significativa entre los grupos de 1-8 y 10-21 días de edad ($p=0.35$).

Por otra parte, el análisis de varianza de una sola vía (ANOVA) brindó significancia estadística en la expresión de IL-2 entre los grupos de 1-8 días y 22-47 días de edad ($p=0.004$); y en la expresión de TNF- α entre los grupos de 1-8 días y 22-47 días de edad ($p=0.012$) y entre los grupos de 10-21 días y 22-47 de días de edad ($p=0.046$) (Figuras A.14 y A.15).

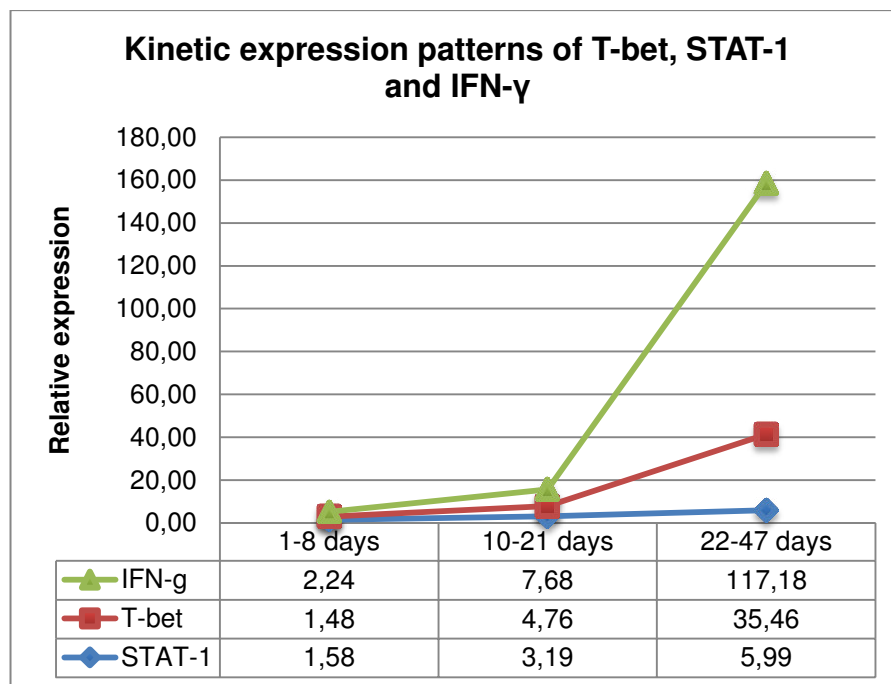


Figura 6. Expresión relativa de T-bet, STAT-1 e IFN- γ . Nótese la tendencia positiva respecto a la edad, con significancia estadística en T-bet e IFN- γ ($p < 0.05$) y no significancia en STAT-1 ($p > 0.05$).

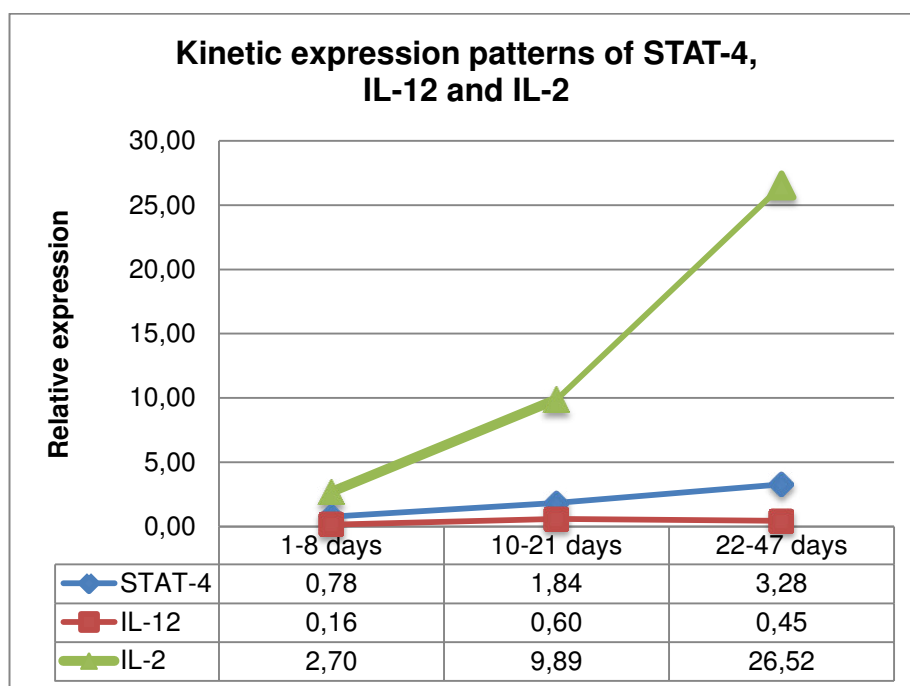


Figura 7. Expresión relativa de STAT-4, IL-12 e IL-2. Nótese la tendencia positiva respecto a la edad en STAT-4 ($p > 0.05$) e IL-2 ($p < 0.05$), y la máxima expresión en el grupo de 10-21 días de edad en IL-12 ($p > 0.05$).

V. DISCUSIÓN

Desde el 2010 se han venido realizando estudios transversales *in vivo* relacionados a la respuesta inmune innata y adaptativa en la mucosa intestinal de crías de alpaca sanas y con enteropatías, así como *in vitro* a través de cultivos de linfocitos con antígenos clostridiales (Tambillo *et al.*, 2013; Watanabe *et al.*, 2014). Sin embargo, pese a que han brindado alcances sobre expresión génica de citoquinas, éstos no han sido del todo concluyentes, debido, principalmente, al análisis aislado de interleucinas y no de perfiles celulares completos incluyendo sus factores transcripcionales ni marcadores de superficie.

El presente estudio tuvo como objetivo evaluar la respuesta inmune celular *in vitro*, estableciendo la cinética de expresión de las interleucinas y factores transcripcionales involucrados en la activación y diferenciación del subtipo 1 de los linfocitos T colaboradores, también llamados “cooperadores” o “de ayuda” (*T helper*) en la mucosa intestinal de tres grupos etarios de crías de alpacas aparentemente sanas en un rango de 2 a 47 días de edad, basado en el método de cuantificación relativa de los transcritos de ARN mensajero. Los linfocitos Th1 participan en el desarrollo de la respuesta inmune celular adquirida.

Por razones estrictamente logísticas y de disponibilidad presupuestal, el presente estudio se basó en la evaluación transcriptómica de las citoquinas y factores transcripcionales involucrados en la activación y diferenciación del perfil Th1 CD4⁺ mediante RT-qPCR (PCR en tiempo real cuantitativa), tal como fue señalado en el Proyecto N°180-FINCyT-IB-2013, mas no de marcadores de superficie celular, ítem de relevante importancia a fin de identificar con certeza poblaciones celulares mediante

citometría de flujo. En términos generales, la tendencia observada en todas las citoquinas y factores transcripcionales fue ascendente acorde al grupo etario, a excepción de IL-12 cuya máxima expresión correspondió al grupo de 10-21 días de edad. Las cinéticas de expresión sobresalientes ($p < 0.05$), en términos cuantitativos, correspondieron a las del factor transcripcional T-bet y a las citoquinas IFN- γ e IL-2, con valores de 35.46, 117.18 y 26.52 veces lo expresado por el calibrador, respectivamente, en el grupo etario conformado por animales de 22-47 días de edad; mientras que las expresiones inferiores correspondieron a TNF- α ($p < 0.05$), IL-12, STAT-4 y STAT-1 ($p > 0.05$) para el mismo grupo etario fueron de 5.39, 0.45, 3.28 y 5.99 veces lo expresado por el calibrador, respectivamente.

La mucosa intestinal de las crías se encuentra en constante estimulación con antígenos de la microbiota autóctona y alóctona (Kumate *et al.*, 2009), por tanto, de allí que se empiecen a expresar citoquinas moduladoras de las células linfoides a dicho nivel, entre las que se encuentran tanto células de la inmunidad innata y adquirida, como los linfocitos T $\gamma\delta$ intraepiteliales, linfocitos T $\alpha\beta$, células dendríticas, plasmocitos y enterocitos. Las células T gamma/delta (T $\gamma\delta$) representan un pequeño subconjunto de células T que poseen un receptor de linfocitos T (TCR) distinto en su superficie. La mayoría de los linfocitos T son $\alpha\beta$ (alfa beta) con TCR compuestos por dos cadenas de glicoproteína llamadas cadena α (alfa) y β (beta) de receptores de células T. En cambio, las células $\gamma\delta$ tienen un TCR formado por una cadena γ (gamma) y una cadena δ (delta). Este grupo de células T suele ser menos frecuente que los linfocitos T $\alpha\beta$, pero se encuentran en gran abundancia en la mucosa intestinal, entre una población de linfocitos conocida como linfocitos intraepiteliales (Holtmeier y Kabelitz, 2005).

Los mecanismos de las respuestas inmune innata y adquirida forman un sistema integrado de defensa del hospedero, en el cual numerosas células y moléculas funcionan colectivamente. La naturaleza de la respuesta inespecífica temprana es un factor de suma importancia, ya que influye en el tipo de respuesta específica que se desarrollará subsiguientemente. De igual manera, la inmunidad adquirida puede intervenir durante la inmunidad natural. En este sentido, los fagocitos mononucleares son importantes participantes en ambas interacciones. Después de haber ingerido al patógeno, los macrófagos durante una reacción de inmunidad innata muestran sobre su superficie antígenos del microorganismo, los cuales pueden ser reconocidos por los linfocitos T

antígeno-específicos, mientras las células T y B producen citoquinas, tales como el IFN- γ con la finalidad de incrementar las funciones microbicidas de los macrófagos. Por lo tanto, la interrelación entre la inmunidad natural y la específica es bidireccional y está mediada, en gran parte, por las interleucinas.

El fenotipo Th1 se caracteriza por una fuerte producción de IFN- γ , expresión del receptor de IL-12 (IL-12R) y del factor transcripcional T-bet (Giuliani, 2013). La síntesis de IFN- γ por los linfocitos Th1 está mediada por la activación en cadena de los factores de transcripción STAT1 y T-bet, el primero activa al segundo, estimulando la transcripción del ARN mensajero de interferón gamma (Abbas *et al.*, 2012). No obstante, debido a que esta citoquina es también producida por las células asesinas naturales (*natural killer*, NK) de la inmunidad innata (Vivier *et al.*, 2008), los linfocitos T CD8⁺ de la inmunidad adquirida (Schenkel *et al.*, 2013) y linfocitos T $\gamma\delta$, sumado a que la expresión de STAT-1 no fue significativa, mientras que sí lo fue en T-bet, cuya mayor expresión fue de hasta 35 veces lo expresado por el calibrador en el grupo etario de mayor edad, no podría descartarse la participación de estas células en la producción de esta citoquina.

Más aún, la producción de IFN- γ está mediada, adicionalmente, por una citoquina involucrada en la diferenciación del linfocito Th0 a Th1, la interleucina 12, la que es producida por las células dendríticas y macrófagos durante la presentación antigénica y activación del linfocito T. Esta IL-12 se une a su receptor en la membrana del linfocito y activa al factor de transcripción STAT-4, el que, a su vez, estimula la transcripción del ARN mensajero de interferón gamma a nivel del núcleo. Sin embargo, las cinéticas de las expresiones de IL-12 y STAT-4 no fueron significativas en los tres grupos etarios, sumado a que la expresión de IL-12R no fue evaluada en el presente estudio. En efecto, mientras que la expresión de STAT-4 mostró una tendencia positiva proporcional a la edad, la de IL-12 presentó su máxima expresión en el grupo de 10 a 21 días de edad que inclusive se mostró por debajo de la del control calibrador. Por lo tanto, se evidencia una producción exógena de IFN- γ con una posible participación activa de células NK, linfocitos T $\gamma\delta$ y TCD8⁺ citotóxicos, sumado también a una posible interacción con agentes intracelulares parasitarios (coccidias, *Cryptosporidium spp.*) o virales como rotavirus y coronavirus.

Chiok (2012) cuantificó relativamente IL-2, IFN- γ , IL-4 e IL-10 en animales sanos y con enteropatías de 0 a 45 días de edad, agrupados en 6 semanas. En los animales sanos se encontró una expresión basal (por debajo del calibrador) no significativa de IL-2 en animales de la primera, segunda y tercera semana de edad, con un pico máximo de 3.62 veces lo expresado por el calibrador (animal recién nacido sin consumo de calostro) en los animales de cuatro semanas de edad, descendiendo abruptamente a niveles basales en los animales de la quinta y sexta semana de edad. En los animales enfermos se encontró diferencia estadística significativa ($p < 0.05$) en los seis grupos etarios con expresiones de 471.36, 459.69, 536.87, 1019.45, 533.86 y 392.36 veces lo expresado por el calibrador, respectivamente, según semana de edad. En el caso de IFN- γ , se observó expresiones de 192.81, 285.78, 882.26, 1096.37, 943.73 y 482.02 veces lo expresado por el calibrador en el grupo conformado por animales sanos, y de 8811.14, 7274.45, 3341.69, 8328.84, 8793.36 y 6417.06 veces lo expresado por el calibrador en el grupo conformado por animales enfermos; según grupo etario en orden cronológico ascendente, los que, según Chiok (2012), presentaron diferencia significativa. Sin embargo, no adjunta el análisis estadístico y el *post hoc* correspondientes que corroboren su afirmación; ni las pruebas de normalidad de los $2^{-\Delta\Delta C_t}$ de las cuatro citoquinas evaluadas en su estudio. Otra observación adicional es que la data fue presentada en promedios por grupos etarios, sin ser detallada por individuo ni por total de individuos por grupo etario, una consideración de suma importancia puesto que los promedios pueden ser influenciados por valores extremos y no necesariamente representen un valor medio; además de que una parte del total de datos individuales pueden ser excluidos del análisis estadístico, originando, en consecuencia, un sesgo por resultados direccionados, más aún si se tiene en cuenta que la cantidad de individuos evaluados por grupo etario es pequeña.

Bardález *et al.* (2013) evaluó la cinética de expresión de TNF- α en los mismos animales del estudio de Chiok (2012), encontrando, según grupo etario por orden ascendente, expresiones de 6.79, 9.85, 12.96, 15.18, 13.01 y 9.74 en el grupo conformado por animales sanos ($p < 0.05$), y de 15.32, 11.83, 9.18, 25.47, 5.87 y 11.37 en el grupo conformado por animales enfermos ($p < 0.05$). Bardález *et al.* (2013) atribuyeron tales expresiones a la actividad inmunológica y maduración del intestino *per se*, el que es constantemente enfrentado a microorganismos, sin descartar que las

mismas pudieron ser consecuencia de infecciones entéricas subclínicas y no necesariamente estén correlacionadas a la edad del animal.

Los resultados del presente estudio contrastan con aquellos presentados por Chiok (2012) y Bardález *et al.* (2013), lo que puede ser debido a diversos factores, tales como las observaciones mencionadas en párrafos anteriores, animales muestreados con distinta conformación de microbiota intestinal que, inclusive, pudiesen haber estado cursando con infecciones subclínicas o se hayan encontrado en el inicio de un proceso infeccioso, procedencia de las muestras, su procesamiento, tiempo de conservación y, en consecuencia, la calidad de las mismas, protocolos empleados en la toma de muestras, extracción de ARN total y desarrollo de las RT-qPCRs, cebadores empleados, factores intrínsecos en la elaboración de la PCR incluyendo el operador, el termociclador PTC (Peltier Therme Cycler) 200 Chromo 4 (MJ Research, USA) empleado en ambos estudios frente al ABI 7500 (Life Technologies, USA) de última generación del presente trabajo.

Por otro lado, para el montaje inicial de la respuesta Th1 es necesaria la presencia del receptor WSX-1, también conocido como IL-27Ra, CRL1, IL-27R y TCCR, que es un homólogo del receptor beta 2 de la IL-12. El receptor WSX-1 se expresa solamente en tejido linfóide y su concentración es particularmente alta en células Th0 y NK (Chen *et al.*, 2000; Yoshida *et al.*, 2000). La IL-27, citoquina homóloga de IL-12, es el ligante específico de WSX-1. La fuente de IL-27 es la célula dendrítica y su interacción con WSX-1 induce la fosforilación de STAT1, ulterior expresión de T-bet en LTh0 e incremento en la producción de IFN- γ por IL-12 (Takeda *et al.*, 2003). Las señalizaciones vía IL-27/WSX-1 constituyen un paso previo a la estimulación del sistema IL-12R y son necesarias para dar inicio a la diferenciación a Th1. Sin embargo, recientemente se ha demostrado que estas señalizaciones son críticas para la regulación negativa de procesos inflamatorios (Villarino *et al.*, 2003). De hecho, limitan la duración e intensidad de activación de la célula T provocada por infecciones a *Toxoplasma gondii* y *Trypanosoma cruzi* (Hamano *et al.*, 2003). No obstante, en el presente estudio no se evaluó la expresión génica relativa de este receptor ni de IL-27.

Una consideración de suma importancia es el análisis histopatológico de las muestras de tejido intestinal. Si bien el presente estudio se limitó al análisis de expresión génica

de las citoquinas y factores transcripcionales del perfil Th1 a partir de muestras de animales clínicamente sanos cuyos intestinos delgados presentaron una apariencia macroscópica normal, un estudio paralelo del Proyecto N°180-FINCyT-IB-2013 en el que se incluyó el análisis histopatológico de estas mismas muestras detectó la presencia de cuerpos basófilos unidos al ribete en cepillo intestinal compatibles con *Cryptosporidium sp.* en dos animales de 8 y 13 días de edad, y estructuras compatibles con *Eimeria spp.* a nivel de las criptas de Lieberkühn en un animal de 47 días de edad. Diez de los 18 animales muestreados (56%) presentaron hiperplasia de enterocitos y acinos glandulares, infiltración leucocitaria y descamación de vellosidades intestinales, traducidos en una leve enteritis catarral difusa aguda, de los cuales nueve correspondían a los dos grupos etarios de mayor edad (Burga, comunicación personal). Estos hallazgos explicarían la dinámica en la expresión génica positiva significativa de los ARN mensajeros de IL-2, TNF- α , IFN- γ y T-bet y no significativa de STAT-1 y STAT-4, a su vez que evidencian signos de inflamación por infección con parásitos intracelulares.

Pese a que las muestras intestinales analizadas en el presente estudio provinieron de animales clínicamente sanos sin signos de diarrea, la presencia de *Eimeria spp.* y *Cryptosporidium spp.* evidencia infección en tres de los 18 animales estudiados. En un estudio caso-control en alpacas provenientes de diversas unidades alpaqueras de las localidades de Chillihua y La Raya, correspondientes al distrito de Maranganí, provincia de Canchis, departamento de Cusco, durante los meses de febrero y marzo (temporada de parición) del 2006, Villacorta *et al.* (2009) determinaron que las alpacas menores de 15 días de edad que presentan *Cryptosporidium parvum* tienen 4.3 veces mayor predisposición a sufrir diarreas en relación a aquellas que no presentan el parásito.

Eimeria spp. es uno de los principales patógenos causantes de mortalidad en crías de alpaca. Se han descrito cinco especies en llamas y alpacas: *Eimeria alpaca*, *E. lamae* y *E. punoensis*, que afectan el epitelio de la vellosidad intestinal (Guerrero, 1967), *E. macusaniensis* (Guerrero, 1967; Rosadio y Ameghino, 1994) y *E. ivitaensis* (Leguía y Casas, 1998), que afectan las criptas de Lieberkühn. En base a estudios nacionales, *E. lamae* es considerada como la coccidia más patógena, seguida de *E. macusaniensis* (Rosadio, comunicación personal). Sin embargo, en un reporte realizado por Palacios *et al.* (2006) en alpacas de 4-5 meses de edad, se señala que *E. ivitaensis*, cuya patogenicidad hasta ese entonces era desconocida, es más patogénica que *E.*

macusaniensis, ocasionando cuadros fatales de diarrea en coinfecciones con esta última. Palacios *et al.* (2006) identificaron esquizontes de *E. macusaniensis* y *E. ivitaensis* dentro de las criptas y en las células epiteliales intestinales del yeyuno e íleon, los que presentaron microvellosidades cortas y fusionadas (lesiones subagudas y crónicas), algunas áreas con pérdida total de la mucosa y exposición de lámina propia, infiltración leucocitaria (linfocitos, células plasmáticas, eosinófilos y neutrófilos) en lámina propia, hiperplasia e hipertrofia de las criptas en yeyuno e íleon. Asimismo, destacaron que los cambios morfológicos más severos traducidos en áreas necróticas con infiltración de células mononucleares y neutrófilos en lámina propia fueron aquellos producidos por *E. ivitaensis*. Por su parte, Rodríguez *et al.* (2012) reportaron la presencia constante de *E. lamae* y *E. macusaniensis* en infecciones coccidiales dobles, triples y cuádruples en alpacas menores de 90 días de edad del Centro de Investigación y Producción (CIP – La Raya) de la Universidad Nacional del Altiplano (Puno, Perú), donde la mayor prevalencia de ooquistes fue observada en crías de 61 a 75 días de edad (94%), seguido del estrato etario de 31 a 45 días (92.7%).

Los animales del presente estudio nacieron entre fines de diciembre 2013 a mediados de febrero 2014, los mismos que fueron criados junto a sus madres en rebaños alimentados con pasto natural bajo un sistema extensivo en la comunidad de Silli y La Raya (Cusco, Perú), condición similar al manejo controlado y calendarizado en el IVITA Maranganí. En este último, la etapa de nacimiento de las crías se da en los meses de enero, febrero y marzo, las que son conjuntamente destetadas en septiembre del mismo año. Pese a que las crías son destetadas en un rango de edad de 6 a 8 meses, desde el primer mes de edad empiezan a ingerir eventualmente pasto (Pezo, comunicación personal), inclusive a los 8 a 10 días de nacidas empiezan a “palotear” (Rosadio, comunicación personal), lo que favorecería la ingesta de ooquistes que estimularía una respuesta inflamatoria celular a nivel de la mucosa intestinal, lo que se traduciría en el incremento significativo proporcional a la edad en la producción de IFN- γ , llegando a una máxima expresión de más de cien veces lo expresado por el calibrador en el grupo etario de 22 a 47 días debido a una mayor exposición al parásito por consumo de pastos contaminados y a la maduración del sistema inmune. No obstante, esta expresión significativa ascendente en el grupo etario de mayor edad estaría influenciada por la del animal de 47 días de edad, ya que, según el análisis individualizado de la cuantificación relativa en interferón gamma (IFN- γ), el sujeto de

estudio de 21 días de edad presentó una expresión de 9.79, el de 26 días, una de 12.92, mientras que los de 38, 39, 41 y 47 días, unas expresiones de 191.82, 80.41, 56.10 y 355.42. Por lo tanto, podría sugerirse que la presencia de eimerias en las criptas de Lieberkühn del animal de 47 días de edad favorecería la descamación de las mismas, y, en cierto grado, la liberación de citoquinas proinflamatorias y de la respuesta inmune adaptativa, como interferón gamma.

Una publicación reciente (Rojas *et al.*, 2016) basada en la identificación de los patógenos causantes de un brote de diarrea ocurrido en entre enero y febrero del 2010 en 50 alpacas de una a cinco semanas de edad de Silli, Cusco, reveló que el 80% fue infectado con *Eimeria spp.*, el 40% con coronavirus, 34% con *E. coli*, 32% con rotavirus, 22% con *Clostridium spp.* y 20% con *Cryptosporidium spp.* La examinación histopatológica de las muestras intestinales reveló que el 88% (44/50) de los animales presentó enteritis catarral, un 8% (4/50), enteritis necrótica, y un 2% (2), enteritis necrótica hemorrágica. Aquellos animales con enteritis necrótica y/o hemorrágica presentaron infecciones múltiples por rotavirus, coronavirus, *Eimeria spp.* y *Clostridium spp.* (4 crías), o coronavirus, *Eimeria spp.*, *E. coli* y *Clostridium spp.* (2 crías). Asimismo, en la mayoría de coinfecciones los agentes involucrados fueron *Eimeria spp.* y un virus (coronavirus o rotavirus), y luego en conjunción con una bacteria (*E. coli* o *Clostridium spp.*) y/o *Cryptosporidium spp.* solo en 6 casos.

Nuevamente, es importante recalcar que la presente tesis fue desarrollada con la finalidad de evaluar la expresión génica de citoquinas y factores transcripcionales del perfil Th1 en mucosa intestinal de crías de alpacas clínicamente sanas, y no al análisis e identificación histopatológica ni molecular de agentes patógenos causales de diarrea. Si bien el estudio de Rojas *et al.* (2016) fue desarrollado en base a un brote diarreico en alpacas de la comunidad de Silli, solo dos animales (2/18) de la presente tesis, uno de 2 días y otro de 2 semanas de edad, provinieron de la misma zona geográfica. El resto (16/18) provino de la comunidad de La Raya, ambas pertenecientes al distrito de Maranganí, provincia de Canchis, departamento de Cusco. Asimismo, debido a que la toma de muestras por necropsia y el análisis molecular de expresión génica es un estudio transversal, no podría descartarse la posibilidad de que el animal de 47 días fuese a presentar una posterior diarrea en caso no hubiese sido incorporado al estudio, ni

que los animales estudiados no hayan presentado exposición alguna inicial a agentes virales.

En el estudio realizado por Rosadio *et al.* (2010c), muestras de tejido intestinal (5 de yeyuno y 103 de íleon) de 108 alpacas neonatas fueron colectadas durante la época de nacimientos (diciembre a marzo) del 2005 al 2008 de tres localidades en tres diferentes regiones al sur del Perú a fin de ser evaluadas histopatológicamente con tinción hematoxilina-eosina a fin de aislar y genotipificar organismos clostridiales. En este estudio sobre la asociación de *Eimeria macusaniensis* con las lesiones en alpacas neonatas muertas por enterotoxemia, el análisis histopatológico de los intestinos delgados (porciones íleon y yeyuno) de los animales infectados reveló alteraciones en la mucosa intestinal traducidas en moderada a severa enteritis catarral, enteritis necrótica severa y enteritis hemorrágica extensa. En la mayoría de los casos de enteritis hemorrágica y necrótica, la superficie luminal estuvo severamente necrotizada presentando microvellosidades fusionadas y cortas, incluso, en algunos casos, la mucosa estuvo severa y difusamente congestionada o hemorrágica con congestión comprometiendo la capa muscular de la mucosa y, ocasionalmente, la submucosa. La lámina propia de la mayoría de los intestinos afectados presentó infiltración masiva de diferentes estadios sexuales y asexuales de coccidias, sumados a la presencia focal de células inflamatorias, en su mayoría mononucleares, pocos neutrófilos y eosinófilos. Los íleon y yeyunos afectados contenían un gran número de *Eimeria macusaniensis* inmaduras distribuidas a lo largo de la mucosa, desde las criptas de Lieberkühn hasta la zona apical de las microvellosidades. De los 108 casos evaluados, de 105 se aisló *Clostridium perfringens* a fin de desarrollar una PCR múltiple para la detección de los genes codificantes de las toxinas α y β 2, encontrándose que sólo el 99.5% de las muestras contenían el gen α y el 10%, el gen β .

A pesar que la enterotoxemia, producida principalmente por *Clostridium perfringens* tipo A y raramente por el tipo C, es considerada la enfermedad más mortal en alpacas neonatas, se ha descrito la coexistencia de este patógeno con eimerias como la principal fuente etiológica responsable de la enteritis necrótica fatal en alpacas neonatas (Leguía, 1991; Rosadio y Ameghino, 1994; Rosadio *et al.*, 2010a). Asimismo, aunque los camélidos sudamericanos son susceptibles a las cinco especies de *Eimeria*, la mayoría de los casos de coccidiosis en llamas y alpacas han sido descritos como asintomáticos y

autolimitantes (Guerrero, 1967; Guerrero *et al.*, 1971; Ameghino y DeMartini, 1991). No obstante, existe alguna evidencia que los camélidos sudamericanos son altamente susceptibles a *E. macusaniensis* ocasionando enfermedad clínica y muerte súbita en alpacas neonatas (Cebra *et al.*, 2007). Los casos reportados de alpacas neonatas afectadas severamente presentaron enteritis necrótica fatal asociada a infecciones masivas con *E. macusaniensis* (Rosadio y Ameghino, 1994) o *E. macusaniensis* en conjunto con *E. ivitaensis* (Palacios *et al.*, 2006). En ambos reportes, la replicación de *E. macusaniensis* fue observada dentro de las criptas de Lieberkühn, inhibiendo la regeneración del epitelio intestinal y desprendiendo la mucosa contribuyendo, por ende, al desenlace fatal en los animales. Pese a los estudios desarrollados, aún queda por dilucidar el posible mecanismo sinérgico de *C. perfringens* con *E. macusaniensis* u otra posible especie de *Eimeria* en el desarrollo de las enteritis necróticas severas y fatales atribuidas a cuadros de enterotoxemia.

Recientemente, se han identificado fuentes de células linfoides innatas (ILCs, *innate lymphoid cells*) que son nuevos miembros identificados del linaje linfoide que presentan papeles emergentes en la mediación de la respuesta inmune y en la regulación de la homeostasis tisular e inflamación. Estas células producen varias citoquinas asociadas a células Th, pero no expresan marcadores de superficie celular que están asociados con otros linajes de células inmunes. Asimismo, estos subconjuntos de células negativas a marcadores de linaje (LIN⁻, *lineage marker-negative*) no expresan TCR y, por lo tanto, no responden de una manera específica al antígeno (Walter *et al.*, 2013). Un conjunto de expertos en el campo ha propuesto que el término de células linfoides innatas debe ser utilizado para definir a las células linfoides innatas LIN⁻, células asesinas naturales (NK, *natural killer*) y células inductoras de tejido linfoide (LTi, *lymphoid tissue-inducer*). Más aún, se ha sugerido que las ILCs deben ser divididas en tres grupos: el primero que incluye a las ILC1s y NK (productoras, principalmente, de IFN- γ), el segundo que incluye sólo a las ILC2s y el tercero que incluye a las ILC3s y las LTi, basados en su habilidad de producir citoquinas asociadas a las células Th de tipo 1, tipo 2 y tipo 17, respectivamente (Walter *et al.*, 2013). Por tanto, no podría descartarse la participación del subgrupo 1 de células linfoides innatas en la producción de interferón gamma, aunque aún no se han realizado estudios sobre la presencia de estas células en la alpaca.

La activación de los receptores tipo Toll (TLRs) por patógenos desencadena la producción de citoquinas y activación de células T, mecanismos de defensa inmune que están ligados a procesos inmunopatológicos. Interesantemente, la producción de IFN- γ por células Th1 CD4⁺ por la vía intrínseca MyD88 durante la respuesta de la mucosa intestinal frente al parásito intracelular *Toxoplasma gondii*, resulta en disbiosis y la eliminación de las células de Paneth, lo que conlleva a la reducción o anulación de la producción y liberación de péptidos antimicrobianos al lumen intestinal, favoreciendo la proliferación descontrolada de bacterias gramnegativas de la familia *Enterobacteriaceae* y, por ende, la exacerbación del cuadro patológico (Raetz *et al.*, 2013).

Por otra parte, Lira *et al.* (2012) identificaron las células de Paneth en las tres porciones del intestino delgado de alpacas en los primeros 21 días de edad mediante inmunohistoquímica, empleando un anticuerpo policlonal antilisozima para la identificación de los gránulos de lisozima en la base de las criptas de Lieberkühn en duodeno, yeyuno e íleon desde el primer día de edad. Como ya fue mencionado en párrafos anteriores, en el presente estudio no se desarrolló un análisis histopatológico de las muestras, por lo que no puede determinarse si la producción de interferón gamma detectada ejercería algún efecto, sea protector o destructor, en las células epiteliales intestinales y de Paneth, como lo encontrado por Raetz *et al.* (2013). Cabe destacar que la cuantificación relativa de expresión génica no está correlacionada a la síntesis de proteínas funcionales.

La expresión creciente de INF γ en la mucosa intestinal de las crías de alpacas puede deberse también a la participación de los linfocitos T $\gamma\delta$ (LT $\gamma\delta$) presentes en un gran número en los epitelios intestinales de estos animales (Manchego, comunicación personal). Los linfocitos T $\gamma\delta$ comparten funciones similares con las células dendríticas, como la captación y presentación de antígeno (Meissner *et al.*, 2003; Reschner *et al.*, 2008) y con otros linfocitos innatos, células NK y NK-T (T asesinos naturales), la actividad citotóxica y tumoricida, además de la estimulación de la maduración de células dendríticas (Münz *et al.*, 2005; Boysen y Storset, 2009).

Se ha determinado que la producción temprana de IFN- γ por los LT $\gamma\delta$ puede jugar un papel en el vínculo de las respuestas innata y adaptativa y contribuir a la tendencia de linfocitos Th1. Price *et al.* (2006) determinaron que las células T $\gamma\delta$ WC1⁺ bovinas

producen grandes cantidades de IFN- γ cuando son sinérgicamente estimuladas por IL-12 e IL-18. Los terneros neonatos mostraron mayor cantidad de linfocitos T $\gamma\delta$ WC1⁺ circulantes en comparación con los animales adultos. Asimismo, la respuesta de estas células fue significativamente mayor en los terneros que en los adultos. Sin embargo, en animales adultos la respuesta de los linfocitos T $\gamma\delta$ WC1⁺ del nódulo linfático a IL-12/IL-18 fue más pronunciada que en las células circulantes. Los autores hipotetizaron que la inducción de la producción de interferón gamma por estos linfocitos mediada por IL-12 o IL-18 es un elemento importante probable de respuesta innata frente a patógenos como *Mycobacterium bovis*. El alto número de estas células en los terneros neonatos y su habilidad inherente de responder a citoquinas inflamatorias, podría ser un factor crucial en las respuestas mejoradas vistas en terneros a la vacunación con BCG (Bacillus Calmette-Guérin).

Se ha señalado que muchas de las respuestas de los linfocitos T $\gamma\delta$ parecen estar dirigidas contra agentes patógenos como bacterias, virus y parásitos e incluso se ha sugerido que estos linfocitos pudieran representar el primer paso en la evolución de la inmunidad adaptativa. En este sentido, se ha observado que los linfocitos T $\gamma\delta$ de bovino responden a PAMPs, por lo que se ha sugerido que desempeñan un papel relevante en la respuesta inmune innata y se ha propuesto que actúan como eslabón entre las respuestas inmunitarias innata y adquirida. Una vez activadas por PAMPs, las células T $\gamma\delta$ son más capaces de proliferar en respuesta a IL-2 o IL-15 en ausencia de antígeno (Bautista, 2011). En el presente estudio, las crías de alpacas fueron mantenidas en condiciones naturales de crianza al pastoreo en donde cargas variables de patógenos bacterianos, virales y parasitarios, estimulan constantemente tanto a los linfocitos T $\alpha\beta$ (Th1 y Th2) como a los T $\gamma\delta$. Un estudio preliminar demostró la participación de los linfocitos Th17 a través de la medición de la expresión relativa de IL-17 e IL-21 en los primeros 30 días de edad en las crías de alpaca (Herrera, 2012).

Además de la secreción de IFN- γ , las células WC1⁺ son capaces de secretar IL-12 y TNF- α , lo que contribuiría a la defensa temprana y tendencia Th1 contra patógenos intracelulares (Price *et al.*, 2006). La capacidad de los LT $\gamma\delta$ de reconocer antígenos que son rápidamente presentados luego de una infección u otras formas de estrés, y de responder en grandes números sin requerir una expansión clonal extensa, permite a las células T $\gamma\delta$ participar en las fases tempranas de la respuesta inmune, conocido como

“fase aferente”. Esto significa que ellos actúan en sincronía con las células inmunes innatas como sensores de desregulación, de este modo establecen respuestas inmunes eferentes mediadas por linfocitos convencionales de la inmunidad adaptativa. En contraste, las células $T\alpha\beta$ $CD4^+$ no serían capaces de participar en la vigilancia inmune de los tejidos, porque su activación requiere la presentación de antígenos procesados por células presentadoras de antígenos, especialmente células dendríticas (Vantourout y Hayday, 2013). Por este motivo, no podría descartarse la participación de las células $T\gamma\delta$ en la producción significativa de interferón gamma en los tres grupos etarios, más aún al considerar que la evaluación de la cuantificación relativa de IL-18 no se desarrolló en el presente estudio y que la expresión génica de IL-12 no fue significativa, lo que enfatizaría la hipótesis que la producción de interferón gamma sería mediada por el subtipo $Th1$ $CD4^+$ con participación de linfocitos $T\gamma\delta$, T $CD8^+$ citotóxicos, células NK y linfoides innatas.

Respecto a los valores del ciclo umbral (C_t , *cycle threshold*) de los factores evaluados, se observaron amplificaciones tempranas desde el ciclo 19 al 36, lo que evidencia la presencia de transcritos de ARN mensajero en las muestras. Asimismo, la expresión del gen endógeno gliceraldehído 3 fosfato deshidrogenasa evidencia la viabilidad del ARN total extraído a partir de cada muestra intestinal, pese al tiempo de conservación. En cuanto al análisis de las curvas de fusión (T_m , *melting temperature* o *melt curve*) de los productos amplificados (especificidad de la PCR tiempo real), los valores extremos se encontraron en un rango máximo de $\pm 0.3^\circ\text{C}$, lo que evidencia, en efecto, la amplificación de transcritos correspondientes al mismo gen diana.

Finalmente, es importante mencionar que los mecanismos de estimulación, inhibición y regulación de las interleucinas y su posible aplicación en la medicina clínica no han sido del todo esclarecidos hasta el momento, por lo que el estudio de las citoquinas y sus efectos se mantiene aún como un campo amplio de investigación. Por lo tanto, el estudio individualizado del perfil $Th1$ en la mucosa intestinal de alpacas jóvenes clínicamente sanas es esencial para el entendimiento parcial de la respuesta inmune celular a ese nivel, a la vez que contribuye al desarrollo de estudios posteriores multidisciplinarios mucho más específicos.

VI. CONCLUSIONES

1. Se observó un incremento positivo a la edad en la expresión de ARN mensajeros de STAT-4 ($p>0.05$), STAT-1 ($p>0.05$), T-bet ($p<0.05$), IFN- γ ($p<0.05$), IL-2 ($p<0.05$) y TNF- α ($p<0.05$), a diferencia de IL-12 en el que la máxima expresión fue observada en el grupo de 10-21 días de edad ($p>0.05$).
2. Se observó la síntesis de ARN mensajeros de IFN- γ , a través de T-bet, como resultado de la activación de linfocitos Th1. Sin embargo, no debe excluirse la participación de otras células inmunes tales como las células NK, linfocitos T $\gamma\delta$ y T citotóxicos CD8⁺ en la producción de esta citoquina de acción retroalimentadora positiva.

VII. SUGERENCIAS

En primer lugar, se sugiere la evaluación de la respuesta innata celular, el análisis de los patrones de expresión de los linfocitos T helper 2, así como de las células NK, linfoides innatas, $T\gamma\delta$ y $T\text{ CD8}^+$. Asimismo, el desarrollo de citometría de flujo a fin de evaluar la predominancia de determinados grupos celulares a través de marcadores celulares. Adicionalmente, se sugiere la ejecución de estudios futuros relacionados a la microbiota en animales clínicamente sanos y animales con enteropatías, así como los perfiles de citoquinas incluyendo sus factores de transcripción. Asimismo, se sugiere una posible participación de *Eimeria spp.* y de microbiota comensal en la estimulación de células dendríticas a través de la activación de receptores tipo Toll en la producción de $\text{IFN-}\gamma$ mediada por MyD88, mecanismo observado en *Toxoplasma gondii*. Finalmente, a fin de obtener amplicones más específicos y resultados más precisos, se sugiere la clonación y secuenciamiento de las secuencias genéticas de las citoquinas y factores transcripcionales evaluados en el presente estudio.

VIII. LITERATURA CITADA

1. **Abbas AK, Murphy KM, Sher A. 1996. Functional diversity of helper T lymphocytes.** Nature 383(6603): 787-793.
2. **Abbas AK, Lichtman AH, Pillai S. 2008.** Inmunología celular y molecular. 6^a ed. Madrid: Elsevier. 576p.
3. **Abbas AK, Lichtman AH, Pillai S. 2012.** Inmunología celular y molecular 7^a ed. Madrid: Elsevier. 546 p.
4. **Ameghino E, DeMartini J. 1991.** Mortalidad en crías de alpacas. Boletín de Divulgación del Instituto Veterinario de Investigaciones Tropicales y de Altura (IVITA). Universidad Nacional Mayor de San Marcos. Lima, Perú. p 71-80.
5. **Bardález C, Manchego A, Chiok KL, Sandoval N, More J, Pezo D, Ramírez M. 2013.** Cinética de expresión del factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α) e interleucina 1 (IL-1) en mucosa intestinal de crías de alpaca (*Vicugna pacos*) sanas y con enteropatía. Rev Inv Vet Perú 24(3): 381-389.
6. **Bautista CR. 2011.** Importance of $\gamma\delta$ T lymphocytes in the bovine immune response. Vet Mex 42(1): 65-75.
7. **Boysen P, Storset AK. 2009.** Bovine natural killer cells. Vet Immunol Immunopathol 130(3-4): 163-177.
8. **Brandtzaeg P. 2007.** Induction of secretory immunity and memory at mucosal surfaces. Vaccine 25(30): 5467-5484.
9. **Brandtzaeg P. 2010.** Function of mucosa-associated lymphoid tissue in antibody formation. Immunol Invest 39(4-5): 303-355.
10. **Brandtzaeg PE. 2002.** Current understanding of gastrointestinal immunoregulation and its relation to food allergy. Ann N Y Acad Sci 964: 13-45.

11. **Cafrune MM, Marín RE, Rigalt FA, Romero SR, Aguirre DH. 2009.** Prevalence of *Eimeria macusaniensis* and *Eimeria ivitaensis* in South American camelids of Northwest Argentina. *Vet Parasitol* 162(3-4): 338-341.
12. **Cebra CK, Valentine BA, Schlipf JW, Bildfell RJ, McKenzie E, Waitt LH, Heidel JR, Cooper J, Löhr CV, Bird KE, Saulez MN, Firshman AM. 2007a.** Atypical coccidiosis in South American camelids. *J Vet Diagn Invest* 19: 122-125.
13. **Cebra CK, Valentine BA, Schlipf JW, Bildfell RJ, McKenzie E, Waitt LH, Heidel JR, Cooper BJ, Löhr CV, Bird KE, Saulez MN, Firshman AM. 2007b.** *Eimeria macusaniensis* infection in 15 llamas and 34 alpacas. *J Am Vet Med Assoc* 230(1): 94-100.
14. **Cebra CK, Mattson DE, Baker RJ, Sonn RJ, Dearing PL. 2003.** Potential pathogens in feces from unweaned llamas and alpacas with diarrhea. *J Am Vet Med Assoc* 223(12): 1806-1808.
15. **Chen Qi, Ghilardi N, Wang H, Baker T, Xie MH, Gurney A, Grewal IS, de Sauvage FJ. 2000.** Development of Th1-type immune responses requires the type I cytokine receptor TCCR. *Nature* 407(6806): 916-920.
16. **Chiok K. 2012.** Expresión de citoquinas de la respuesta Th1 (IFN- γ , IL-2) y Th2 (IL-4, IL-10) en mucosa intestinal de crías de alpaca (*Vicugna pacos*) sanas y con enteropatía. Tesis de Magíster en Ciencias Veterinarias. Lima: Univ. Nac. Mayor de San Marcos. 126 p.
17. **Cid M, Martín C. 2010.** Diarreas neonatales en alpacas. En: Cid, M. Sanidad de alpacas en la etapa neonatal. 1ª ed. Madrid: Editorial Complutense. p 92-142.
18. **D'Alterio GL, Bazeley K, Pearson GR, Jones JR, Jose M, Woodward MJ. 2003.** Meningitis associated with *Salmonella* Newport in a neonatal alpaca (*Lama pacos*) in the United Kingdom. *Vet Rec* 152(2): 56-57.
19. **De Jong EC, Vieira PL, Kalinski P, Schuitemaker JH, Tanaka Y, Wierenga EA, Yazdanbakhsh M, Kapbserberg ML. 2002.** Microbial compounds selectively induce Th1 cell-promoting or Th2 cell-promoting dendritic cells *in vitro* with diverse Th cell-polarizing signals. *J Immunol* 168(4): 1704-1709.
20. **De Waal Malefyt R, Abrams JS, Zurawski SM, et al. 1995.** Differential regulation of IL-13 and IL-4 production by human CD8⁺ and CD4⁺ Th0, Th1 and Th2 T cell clones and EBV-transformed B cells. *Int Immunol* 7: 1405-1416.

21. **Dionisio J, Manchego A, Chiok KL, Sandoval N, More J, Pezo D, Rivera H. 2014.** Cinética de expresión de inmunoglobulina A en el epitelio intestinal de crías de alpaca (*Vicugna pacos*). Rev Inv Vet Perú 25(2): 151-161.
22. **[FAO] Food and Agriculture Organization. 2005a.** Situación actual de los camélidos sudamericanos en Perú. Perú: Proyecto de Cooperación Técnica en apoyo a la crianza y aprovechamiento de los camélidos sudamericanos en la región andina TCP/RLA/2914.
23. **[FAO] Food and Agriculture Organization. 2005b.** Situación actual de los camélidos sudamericanos en Argentina. Argentina: Proyecto de Cooperación Técnica en apoyo a la crianza y aprovechamiento de los camélidos sudamericanos en la región andina TCP/RLA/2914.
24. **Foster AP, Otter A, Barlow AM, Pearson GR, Woodward MJ, Higgins RJ. 2008.** Naturally occurring intestinal lesions in three alpacas (*Vicugna pacos*) caused by attacking and effacing *Escherichia coli*. Vet Rec 162(10): 318-320.
25. **Garmendia AE, Palmer GH, DeMartini JC, McGuire TC. 1987.** Failure of passive immunoglobulin transfer. A major determinant of mortality in newborn alpacas *Lama pacos*. Am J Vet Res 49(10): 1472-1476.
26. **Genova SG, Streeter RN, Simpson KM, Kapil S. 2008.** Detection of an antigenic group 2 coronavirus in an adult alpaca with enteritis. Clin Vaccine Immunol 15(10): 1629-1632.
27. **Gentry A, Clutton-Brock J, Groves CP. 2004.** The naming of wild animal species and their domestic derivatives. J Archaeol Sci 31(5): 645-651.
28. **Gómez-Couso H, Ortega-Mora LM, Aguado-Martínez A, Rosadio-Alcántara R, Maturrano-Hernández L, Luna-Espinoza L, et al. 2011.** Molecular characterization of *Giardia* and *Cryptosporidium* in alpacas (*Vicugna pacos*) from Peru. XXIII International Conference World Association for Advancement of Veterinary Parasitology. Buenos Aires, Argentina.
29. **Guerrero CA. 1967.** Coccidia (Protozoo: Eimeriidae) of the alpaca *Lama pacos*. J Protozool 14: 613-616.
30. **Guerrero CA, Alva J, Leguía G, Bazalar H. 1970.** Prevalencia de coccidias (Protozoo: Eimeriidae) of the alpaca *Lama pacos*. Bol Ext IVITA 4: 84-90.
31. **Guerrero CA, Hernández J, Bazalar H, Alva J. 1971.** *Eimeria macusaniensis* (Protozoo: Eimeriidae) of the alpaca *Lama pacos*. J Protozool 18: 162-163.

32. **Hamano S, Himeno K, Miyazaki Y, Ishii K, Yamanaka A, Takeda A, Zhang M, Hisaeda H, Mak TW, Yoshimura A, Yoshida H. 2003.** WSX-1 is required for resistance to *Trypanosoma cruzi* infection by regulation of proinflammatory cytokine production. *Immunity* 19(5): 657-667.
33. **Hausman GJ, Barb CR, Fairchild BD, Gamble J, Lee-Rutherford L. 2014.** Gene expression profiling in adipose tissue from growing broiler chickens. *Adipocyte* 3(4): 297-303.
34. **Herrera A. 2012.** Determinación de linfocitos colaboradores 17 (Th17) en mucosa intestinal de crías de alpaca (*Vicugna pacos*). Tesis de Magíster en Ciencias Veterinarias. Lima: Univ. Nac. Mayor de San Marcos. 98 p.
35. **Hinostroza R, Manchego A, Sandoval N, Chiok KL, More J. 2015.** Expresión de citoquinas pro-inflamatorias de leucocitos de alpaca (*Vicugna pacos*) inducidos por el extracto de macroquistes de *Sarcocystis aucheniae*. *Rev Inv Vet Perú* 26(2): 328-341.
36. **Holmgren J, Czerkinsky C. 2005.** Mucosal immunity and vaccines. *Nat Med* 11(4): S45-S53.
37. **Holtmeier W, Kabelitz D. 2005.** $\gamma\delta$ T cells link innate and adaptive immune responses. *Chem Immunol Allergy* 86: 161-183.
38. **Huber JP, Ramos HJ, Gill MA, Farrar JD. 2010.** Cutting edge: type I IFN reverses human Th2 commitment and stability by suppressing GATA3. *J Immunol* 185(2): 813-817.
39. **Jarnicki AG, Fallon PG. 2003.** T helper type-2 cytokine responses: potential therapeutic targets. *Curr Opin Pharmacol* 3(4): 449-455.
40. **Kadwell M, Fernandez M, Stanley HF, Baldi R, Wheeler JC, Rosadio R, Bruford MW. 2001.** Genetic analysis reveals the wild ancestors of the llama and the alpaca. *Proc R Soc Lond* 268: 2575-2584.
41. **Kumate J, Gutiérrez G, Muñoz O, Santos I, Solórzano F, Miranda G. 2008.** Capítulo 2: Microbiota normal. *Infectología Clínica Kumate-Gutiérrez* 17^a Ed. México: Méndez Editores. 949 p.
42. **Lau KS, Cartez-Retamozo V, Philips SR, Pittel MJ, Lauffenburger DA, Haigis KM. 2012.** Multi-scale *in vivo* systems analysis reveals the influence of immune cells on TNF- α -induced apoptosis in the intestinal epithelium. *PLoS Biol* 10(9): e1001393. 10.1371/journal.pbio.1001393

43. **Lau KS, Juchheim AM, Cavaliere KR, Philips SR, Lauffenburger DA, Haigis KM. 2011.** In vivo systems analysis identifies spatial and temporal aspects of the modulation of TNF- α induced apoptosis and proliferation by MAPKs. *Sci Signal* 4(165): ra16.
44. **Leguía G. 1991.** The epidemiology and economic impact of llama parasites. *Parasitol Today* 7(2): 54-56.
45. **Leguía G, Casas E. 1998.** *Eimeria ivitaensis* (Protozoo: Eimeriidae) en alpacas (*Lama pacos*). *Rev Per Parasitol* 13: 59-61.
46. **Life Techonologies Corporation. 2006.** SuperScript™ III First-Strand Synthesis SuperMix for qRT-PCR. [12 noviembre 2014]. Disponible en: http://tools.lifetechnologies.com/content/sfs/manuals/superscript_firststrand_qrtpcr_man.pdf
47. **Life Techonologies Corporation. 2010.** SYBR® GreenER™ qPCR SuperMix Universal. [12 noviembre 2014]. Disponible en: http://tools.lifetechnologies.com/content/sfs/manuals/sybrgreener_supermix_uni_man.pdf
48. **Lira B, Cueva S, Rodríguez J, Ayón M, Zanuzzi C, Barbeito C, Falcón N, Vásquez M. 2012.** Identificación de las células de Paneth en el intestino delgado de alpacas en los primeros 21 días de edad. *Rev Inv Vet Perú* 23(2): 138-146.
49. **Livak KJ, Schmittgen TD. 2001.** Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta C_t}$ method. *Methods* 25(4): 402-408.
50. **López-Urbina MT, González AE, Gómez-Puerta LA, Romero-Arbizu MA, Perales-Camacho RA, Rojo-Vázquez FA, Xiao L, Cama V. 2009.** Prevalence of neonatal cryptosporidiosis in Andean alpacas (*Vicugna pacos*) in Peru. *The Open Parasitology Journal* 3: 9-13.
51. **Luna L, Maturrano L, Rivera H, Zanabria V, Rosadio R. 2012.** Genotipificación, evaluación toxigénica *in vitro* y sensibilidad a antibióticos de cepas de *Escherichia coli* aisladas de casos diarreicos y fatales en alpacas neonatas. *Rev Inv Vet Perú* 23: 280-288.
52. **Macpherson AJ, Uhr T. 2004.** Induction of protective IgA by intestinal dendritic cells carrying commensal bacteria. *Science* 303: 1662-1665.
53. **Marín JC, Zapata B, González BA, Bonacic C, Wheeler JC, Casey C, Bruford MW, Palma ER, Poulín E, Alliende MA, Spotorno AE. 2007.**

- Sistemática, taxonomía y domesticación de alpacas y llamas: nueva evidencia cromosómica y molecular. *Rev Chil Hist Nat* 80(2): 121-140.
54. **Martín C, Pinto CE, Cid MD. 2010.** Camélidos sudamericanos: estado sanitario de sus crías. *Revista Complutense de Ciencias Veterinarias* 4(1): 37-50.
 55. **McGhee JR, Fujihashi K. 2012.** Inside the mucosal immune system. *PLoS Biol* 10(9): e10001397.
 56. **Meissner N, Radke J, Hedges JF, White M, Behnke M, Bertolino S, Abrahamsen M, Jutila MA. 2003.** Serial analysis of gene expression in circulating gamma delta T cell subsets defines distinct immunoregulatory phenotypes and unexpected gene expression profiles. *J Immunol* 170(1): 356-364.
 57. **Mercado EC, Rodríguez SM, Elizondo AM, Marcoppido G, Parreño V. 2004.** Isolation of shiga toxin-producing *Escherichia coli* from a South American camelid (*Lama guanicoe*) with diarrhea. *J Clin Microbiol* 42(10): 4809-4811.
 58. **Molina D, López T, González A, Gómez L, Pezo D. 2009.** *Cryptosporidium parvum* como factor de riesgo en la diarrea neonatal en alpacas de Puno. *Rev Inv Vet Perú* 20(2): 263-269.
 59. **More J, Manchego A, Sandoval N, Ramírez M, Pezo D, Chiok KL, Rivera G. 2011.** Detección genómica y expresión de péptidos antimicrobianos (α - y β -defensinas) en mucosa intestinal de crías de alpacas (*Vicugna pacos*). *Rev Inv Vet Perú* 22(4): 324-335.
 60. **More J. 2013.** Efecto de antígenos clostridiales con ácido retinoico sobre la expresión de citoquinas de la respuesta inmune humoral y celular de la mucosa intestinal de crías de alpacas (*Vicugna pacos*). Tesis de Magíster en Ciencias Veterinarias. Lima: Univ. Nac. Mayor de San Marcos. 105 p.
 61. **Mosmann TR, Coffman RL. 1989.** Th1 and Th2 cells: different patterns of lymphokine secretion lead to different functional properties. *Ann Rev Immunol* 7: 145-173.
 62. **Münz C, Steinman RM, Fujii S. 2005.** Dendritic cell maturation by innate lymphocytes: coordinated stimulation of innate and adaptive immunity. *J Exp Med* 202(2): 203-207.
 63. **Norambuena C, Paredes M. 2003.** Variabilidad y estructura genética en dos poblaciones de *Vicugna vicugna* (Camelidae) del norte de Chile. *Rev Chi Hist Nat* 76(1): 99-104.

64. **Obdileg R, Konnai S, Usui T, Ohashi K, Onuma M. 2005a.** Quantification of Llama inflammatory cytokine mRNAs by real-time RT-PCR. J Vet Med Sci 67(2): 195-198.
65. **Obdileg R, Konnai S, Ohashi K, Onuma M. 2005b.** Molecular cloning and phylogenetic analysis of inflammatory cytokines of *Camelidae* (Llama and Camel). J Vet Med Sci 67(9): 921-925.
66. **Odbileg R, Purevtseren B, Batsukh Z, Konnai S, Ohashi K, Onuma M. 2006.** Complete cDNA sequences and phylogenetic analysis of the Th1 and Th2 cytokines of the bactrian camel (*Camelus bactrianus*). J Vet Med Sci 68(9): 941-946.
67. **Odbileg R, Purevtseren B, Gantsetseg D, Boldbaatar B, Buyannemekh T, Galmandakh Z, Erdenebaatar J, Konnai S, Onuma M, Ohashi K. 2008.** Cytokine responses in camels (*Camelus bactrianus*) vaccinated with *Brucella abortus* strain 19 vaccine. J Vet Med Sci 70(2): 197-201.
68. **Opal SM, DePalo VA. 2000.** Anti-Inflammatory cytokines. Chest 117(4): 1162-1172.
69. **Palacios C. 2008.** Estudio caso control del *Cryptosporidium* como factor de riesgo en la diarrea neonatal en alpacas menores a 15 días. Tesis de Magíster. Lima: Univ Nac Mayor de San Marcos. 73 p.
70. **Palacios CA, Perales RA, Chavera AE, López MT, Braga WU, Moro M. 2006.** *Eimeria macusaniensis* and *Eimeria ivitaensis* co-infection in fatal cases of diarrhea in young alpacas (*Lama pacos*) in Peru. Vet Rec 158(10): 344-345.
71. **Palacios C, Perales R, Chavera A, López MT. 2005.** Caracterización anatómo-histopatológica de enteropatías causantes de mortalidad en crías de alpacas. Rev Inv Vet Perú 16(1): 34-40.
72. **Parreño V, Constantini V, Cheetham S, Blanco Viera J, Saif LJ, Fernández F, Leoni L, Schudel A. 2001.** First isolation of rotavirus associated with neonatal diarrhea in guanacos (*Lama guanicoe*) in the Argentinian Patagonia region. J Vet Med B Infect Dis Vet Public Health 48(9): 713-720.
73. **Pérez D. 2010.** Caracterización toxigénica de la fosfolipasa C del *Clostridium perfringens* (Cp-PLC) y su relación con aislados casos de enterotoxemia en alpacas. Tesis de Magíster. Lima: Univ Nac Mayor de San Marcos. 151 p.

74. **Pérez D. 2006.** Genotipificación y subtipificación de *Clostridium perfringens* aislados de crías de alpacas muertas por enterotoxemia. Tesis de Médico Veterinario. Lima: Univ Nac Mayor de San Marcos. 91 p.
75. **Price SJ, Sopp P, Howard CJ, Hope JC. 2007.** Workshop cluster 1⁺ $\gamma\delta$ T-cell receptor⁺ T cells from calves express high levels of interferon- γ in response to stimulation with interleukin-12 and -18. *Immunology* 120(1): 57-65.
76. **Prohl A, Wolf K, Weber C, Müller KE, Menge C, Sachse K, Rödel J, Reinhold P, Berndt A. 2015.** Kinetics of local and systemic leucocyte and cytokine reaction of calves to intrabronchial infection with *Chlamydia psittaci*. *PLoS One* 10(8): e0135161.
77. **Raetz M, Hwang SH, Wilhelm CL, Kirkland D, Benson A, Sturge CR, Mirpuri J, Vaishnav S, Hou B, Defranco AL, Gilpin CJ, Hooper LV, Yarovinsky F. 2013.** Parasite-induced Th1 cells and intestinal dysbiosis cooperate in IFN- γ -dependent elimination of Paneth cells. *Nat Immunol* 14(2): 136-142.
78. **Ramírez A. 1991.** Enfermedades infecciosas. En: Fernández-Baca S, ed. Avances y perspectivas del conocimiento de los camélidos sudamericanos. Santiago: FAO. 263-264p.
79. **Ramírez A, Ellis R, Sumar J, Leyva V. 1985a.** *E. coli* enteropatógena en alpacas neonatales: aislamiento de intestino delgado y su inoculación oral. En: Libro de resúmenes. V Convención Internacional sobre Camélidos Sudamericanos. Cusco, Perú. p 34.
80. **Ramiro-Puig E, Pérez-Cano FJ, Castellote C, Franch A, Castell M. 2008.** El intestino: pieza clave del sistema inmunitario. *Rev Esp Enferm Dig* 100(1): 29-34.
81. **Rao A, Avni O. 2000.** Molecular aspects of T-cell differentiation. *Br Med Bull* 56(4): 969-984.
82. **Reschner A, Hubert P, Delvenne P, Boniver J, Jacobs N. 2008.** Innate lymphocyte and dendritic cell cross-talk: a key factor in the regulation of the immune response. *Clin Exp Immunol* 152(2): 219-226.
83. **Rodríguez A, Casas E, Luna L, Gaviria C, Zanabria V, Rosadio R. 2012.** Eimeriosis en crías de alpacas: prevalencia y factores de riesgo. *Rev Inv Vet Perú* 23(3): 289-298.
84. **Rojas M, Manchego A, Rocha CB, Fornells LZ, Silva RC, Mendes GS, Dias HG, Sandoval N, Pezo D, Santos N. 2016.** Outbreak of diarrhea among

- preweaning alpacas (*Vicugna pacos*) in the southern Peruvian highland. *J Infect Dev Ctries* 10(3): 269-274.
85. **Romagnani S. 2000.** T-cell subsets (Th1 versus Th2). *Ann Allergy Asthma Immunol* 85(1): 9-18.
 86. **Romagnani S. 1995.** Biology of human Th1 and Th2 cells. *J Clin Immunol* 15(3): 121-129.
 87. **Rosadio R, Maturrano L, Pérez D, Luna L. 2012.** El complejo entérico neonatal en alpacas andinas. *Rev Inv Vet Perú* 23(3): 261-271.
 88. **Rosadio R. 2010a.** Mortalidad neonatal en alpacas. En: Cid, M. Sanidad de alpacas en la etapa neonatal. 1ª ed. Madrid: Editorial Complutense. p 80-92.
 89. **Rosadio R, Castillo H, Véliz A. 2010b.** Algunos aspectos en el sistema de manejo de las alpacas. En: Cid, M. Sanidad de alpacas en la etapa neonatal. 1ª ed. Madrid: Editorial Complutense. p 143-148.
 90. **Rosadio R, Londoño P, Pérez D, Castillo H, Véliz A, Llanco L, Yaya K, Maturrano L. 2010c.** *Eimeria macusaniensis* associated lesions in neonate alpacas dying from enterotoxemia. *Vet Parasitol* 168(1-2): 116-120.
 91. **Rosadio R, Ameghino E. 1994.** Coccidial infections in neonatal Peruvian alpacas. *Vet Rec* 135: 459-460.
 92. **Rulofson FC, Atwill ER, Holmberg CA. 2001.** Fecal shedding of *Giardia duodenalis*, *Cryptosporidium parvum*, *Salmonella* organisms, and *Escherichia coli* O157:H7 from llamas in California. *Am J Vet Res* 62(4): 637-642.
 93. **Sarno RJ, Villalba L, Bonacic Ch, González B, Zapata B, MacDonald DW, O'Brien SJ, Johnson WE. 2004.** Phylogeography and subspecies assessment of vicuñas in Chile and Bolivia utilizing mtDNA and microsatellites markers: implications for vicuña conservation and management. *Conservation Genetics* 5: 89-102.
 94. **Saulez MN, Cebra CK, Valentine BA. 2004.** Necrotizing hepatitis associated with enteric salmonellosis in an alpaca. *Can Vet J* 45(4): 321-323.
 95. **Schenkel JM, Fraser KA, Vezys V, Masopust D. 2013.** Sensing and alarm function of resident memory CD8+ T cells. *Nat Immunol* 14(5): 509-513.
 96. **Siuce J, Manchego A, Sandoval N, More J, Chiok KL, Pezo D, Rivera H. 2015.** Expresión de defensinas en yeyuno de crías de alpacas (*Vicugna pacos*) con enteropatías. *Rev Inv Vet Perú* 26(2): 317-327.

97. **Sonnenberg GF, Fouser LA, Artis d. 2011.** Border patrol: regulation of immunity, inflammation and tissue homeostasis at barrier surfaces by IL-22. *Nat Immunol* 12(5): 383-390.
98. **Spellberg B, Edwards JE. 2001.** Type 1/Type 2 immunity in infectious diseases. *Clin Infect Dis* 32(1): 76-102.
99. **Sturge CR, Yarovinsky F. 2014.** Complex immune cell interplay in the gamma interferon response during *Toxoplasma gondii* infection. *Infect Immun* 82(8): 3090-3097.
100. **Swindle MM. 1998.** Surgery, anesthesia and experimental techniques in swine. Iowa State University Press.
101. **Takeda A, Hamano S, Yamanaka A, Hanada T, Ishibashi T, Mak TW, Yoshimura A, Yoshida H. 2003.** Cutting edge: role of IL-27/WSX-1 signaling for induction of T-bet through activation of STAT1 during initial Th1 commitment. *J Immunol* 170(10): 4886-4890.
102. **Tambillo L, Manchego A, Chiok KL, Sandoval N, More J, Rivera H. 2013.** Evaluación *in vitro* de la respuesta leucocitaria de alpacas (*Vicugna pacos*) en presencia de antígenos clostridiales. *Rev Inv Vet Perú* 24(4): 510-523.
103. **Tizard IR. 2002.** Inmunología veterinaria. 1^{ra} ed. Méjico: McGraw Hill Interamericana. 517 p.
104. **Tizard IR. 2009.** Introducción a la inmunología veterinaria. 8^{va} ed. Barcelona: Elsevier Saunders. 574 p.
105. **Twomey DF, Barlow AM, Bell S, Chalmers RM, Elwin K, Giles M, Higgins RJ, Robinson G, Stringer RM. 2008.** Cryptosporidiosis in two alpaca (*Lama pacos*) holding in the South-West of England. *Vet J* 175(3): 419-422.
106. **Tylocinski LO, Hajkova P, Chang HD, Stamm T, et al. 2005.** A critical control element for interleukin-4 memory expression in T helper lymphocytes. *J Biol Chem* 280(31): 28177-28185.
107. **Ursing BM, Slack KE, Arnason U. 2000.** Subordinal artiodactyl relationships in the light of phylogenetic analysis of 12 mitochondrial protein-coding genes. *Zool Scripta* 29(2): 83-88.
108. **Vantourout P, Hayday A. 2013.** Six-of-the-best: unique contributions of $\gamma\delta$ T cells to immunology. *Nat Rev Immunol* 13(2): 88-100.

109. **Vega MA. 2007.** Inmunobiología de las mucosas, un nuevo enfoque de la protección y la adaptación al medio de nuestro organismo. *Cinvestav* 26(1): 55-59.
110. **Vega-López MA, Arenas-Contreras G, Bailey M, González-Pozos S, Stokes CR, Ortega MG, Mondragón-Flores R. 2001.** Development of intraepithelial cells in the porcine small intestine. *Dev Immunol* 8(2): 147-158.
111. **Vega-López MA, Telemo E, Bailey M, Stevens K, Stokes CR. 1993.** Immune cell distribution in the small intestine for the pig: immunohistological evidence for an organized compartmentalization in the lamina propria. *Vet Immunol Immunopathol* 37(1): 49-60.
112. **Villacorta C, López T, González A, Gómez L. 2009.** Evaluación de *Cryptosporidium parvum* como factor de riesgo neonatal en alpacas en Cusco. *Rev Inv Vet Perú* 20(2): 277-284.
113. **Villarino A, Hibbert L, Lieberman L, Wilson E, Mak T, Yoshida H, Kastelein RA, Saris C, Hunter CA. 2003.** The IL-27R (WSX-1) is required to suppress T cell hyperactivity during infection. *Immunity* 19(5): 645-655.
114. **Vivier E, Tomasello E, Baratin M, Walzer T, Ugolini S. 2008.** Functions of natural killer cells. *Nat Immunol* 9(5): 503-510.
115. **Vreeburg RA, Bastiann-Net S, Mess JJ. 2011.** Normalization genes for quantitative RT-PCR in differentiated Caco-2 cells used for food exposure studies. *Food Funct* 2(2): 124-129.
116. **Wagner B, Burton A, Ainsworth D. 2010.** Interferon gamma, interleukin-4 and interleukin-10 production by T helper cells reveals intact Th1 and regulatory Tr1 cell activation and a delay of the Th2 cell response in equine neonates and foals. *Vet Res* 41(4): 47.
117. **Waite LH, Cebra CK, Firshman AM, McKenzie EC, Schlipf JW Jr. 2008.** Cryptosporidiosis in 20 alpaca crias. *J Am Vet Med Assoc* 233(2): 294-298.
118. **Walker JA, Barlow JL, McKenzie AN. 2013.** Innate lymphoid cells – how did we miss them? *Nat Rev Immunol* 13(2): 75-87.
119. **Watanabe R. 2015.** Evaluation of the Th1 immune response in the intestinal mucosa of baby alpacas (*Vicugna pacos*). En: 32nd World Veterinary Congress Istanbul Proceedings. Turquía: World Veterinary Congress Istanbul Turkey.

120. **Watanabe R, Manchego A, Rivera H. 2014.** Expresión *in vitro* de las interleucinas 2 y 10 de linfocitos de alpacas (*Vicugna pacos*) en presencia de antígenos clostridiales. *Rev Inv Vet Perú* 25(3): 419-429.
121. **Wernery U. 2001.** Camelid immunoglobulins and their importance for the newborn: a review. *J Vet Med B Infect Dis Vet Public Health* 48(8): 561-68.
122. **Wheeler JC. 2010.** Clasificación de las alpacas (*Vicugna pacos*) dentro de los camélidos sudamericanos. En: Cid, M. Sanidad de alpacas en la etapa neonatal. 1ª ed. Madrid: Editorial Complutense. 19-28p.
123. **Wheeler JC, Fernández M, Rosadio R, Hoces D, Kadwell M, Bruford MV. 2001.** Diversidad genética y manejo de poblaciones de vicuñas en el Perú. *Rev Inv Vet Perú* 1: 170-183.
124. **Wheeler JC. 1995.** Evolution and present situation of the South American Camelidae. *Bio J Lima Soc* 54: 271-295.
125. **Whitehead CE, Anderson DE. 2006.** Neonatal diarrhea in llamas and alpacas. *Small Ruminant Research* 61(2-3): 207-215.
126. **Yoshida H, Hamano S, Senaldi G, Covey T, Faggioni R, Mu S, Xia M, Wakeham AC, Nishina H, Potter J, Saris CJ, Mak TW. 2001.** WSX-1 is required for the initiation of Th1 responses and resistance to *L. major* infection. *Immunity* 15(4): 569-578.
127. **Yssel H, De Waal Malefyt R, Roncarolo MG, Abrams JS, Lahesmaa R, Spits H, de Vries JE. 1992.** IL-10 is produced by subsets of human CD4⁺ T cell clones and peripheral blood T cells. *Am Soc Immunol* 149(7): 2378-2384.
128. **Zanotti C, Razzuoli E, Crooke H, Soule O, Pezzoni G, Ferraris M, Ferrari A, Amadori M. 2015.** Differential biological activities of swine interferón- α subtypes. *J Interferon Cytokine Res*. DOI: 10.1089/jir.2015.0076.

IX. APÉNDICE

Cuadro A.1. Registro de muestreo de animales durante enero y febrero 2014

Identificación	Edad (fecha de nacimiento)	Código de muestra	Condición	Sexo	Procedencia
ALP 01¹	2 días	9y	sano	macho	Silli
ALP 05	2 días		muerto	hembra	Silli
ALP 06¹	2 semanas	25y	sano	NR	Silli
ALP 07	2 semanas		muerto	NR	Silli
ALP 08¹	7 días	32y	sano	hembra	La Raya²
ALP 09¹	41 días	26y	sano	hembra	La Raya²
ALP 10¹	47 días	23y	sano	hembra	La Raya²
ALP 11¹	38 días	21y	sano	macho	La Raya²
ALP 12¹	47 días	27y	sano	NR	La Raya²
ALP 13¹	39 días	16y	sano	NR	La Raya²
ALP 14	2 semanas	25y	tratado	hembra	Silli
ALP 15	2 semanas	34y	tratado	macho	Silli
ALP 16	9 días	12y	tratado	hembra	Silli
ALP 17	9 días	28y	tratado	hembra	Silli
ALP 18	11 días	35y	tratado	macho	Silli
ALP 19¹	3 días	33y	sano	macho	Silli
ALP 20¹	5 días	22y	sano	hembra	La Raya²
	17/02/2014				
ALP 21¹	7 días	30y	sano	NR	La Raya²
ALP 22¹	8 días	37y	sano	macho	La Raya²
	13/02/2014				
ALP 23¹	10 días	29y	sano	macho	La Raya²
	11/02/2014				
ALP 24¹	13 días	20y	sano	hembra	La Raya²
	08/02/2014				
ALP 25¹	26 días	5y	sano	hembra	La Raya²
	26/01/2014				
ALP 26¹	21 días	17y	sano	hembra	La Raya²
	31/01/2014				
ALP 27¹	19 días	38y	sano	hembra	La Raya²
	02/02/2014				
ALP 28¹	20 días	36y	sano	macho	La Raya²
	01/02/2014				

NR: no registrado, tratado: con glutamina

¹Las muestras de los animales resaltados en negrita fueron los evaluados en el presente estudio.

²Centro de Investigación en Camélidos Sudamericanos (CICAS), Universidad Nacional San Antonio Abad del Cusco

Cuadro A.2. Grupos etarios con su código de muestreo respectivo

Grupo etario	Edad (días)	Código de muestreo	Total de animales
Grupo control-calibrador	0	8y-15	2
	0	46y-15	
Grupo 1	1	4y-15	8
	1	45y-15	
	2	9y	
	3	33y	
	5	22y	
	7	30y	
	7	32y	
	8	37y	
Grupo 2	10	29y	6
	13	20y	
	14	25y	
	19	38y	
	20	36y	
	21	17y	
Grupo 3	26	5y	6
	38	21y	
	39	16y	
	41	26y	
	47	23y	
	47	27y	
			22

Cuadro A.3. Cuantificación y cálculo de volúmenes de ARN para la síntesis de 50 ng/μl de ADN complementario (ADNc)

Nº	Concentración de ARN (μg/μl)	Volumen requerido para colocar 1μg ARN en Rx	Agua en Rx de RT (μl)	Cantidad de cDNA (ng) en 20μl de Rx	Cantidad de cDNA (ng) en 20μl de Rx 1:5	Concentración de cDNA (ng/μl) 1:5	Volumen (μl) requerido para colocar 20ng de cDNA en Rx	Cantidad utilizada en PCR (ng)	Agua en Rx PCR (μl)
5y	0.51	1.96	6.04	1000	200	10.00	2	20	
9y	0.17	5.88	2.12	1000	200	10.00	2	20	
12y	0.37	2.70	5.30	1000	200	10.00	2	20	
13y	0.61	1.64	6.36	1000	200	10.00	2	20	
14y	0.38	2.63	5.37	1000	200	10.00	2	20	
16y	0.41	2.44	5.56	1000	200	10.00	2	20	
17y	0.17	5.88	2.12	1000	200	10.00	2	20	
20y	0.16	6.25	1.75	1000	200	10.00	2	20	
21y	0.38	2.63	5.37	1000	200	10.00	2	20	
22y	0.23	4.35	3.65	1000	200	10.00	2	20	
23y	0.15	6.67	1.33	1000	200	10.00	2	20	
25y	0.52	1.92	6.09	1000	200	10.00	2	20	
26y	0.67	1.49	6.51	1000	200	10.00	2	20	
27y	0.37	2.70	5.30	1000	200	10.00	2	20	
28y	0.41	2.44	5.56	1000	200	10.00	2	20	
29y	0.30	3.33	4.67	1000	200	10.00	2	20	
30y	0.39	2.56	5.44	1000	200	10.00	2	20	
31y	0.61	1.64	6.36	1000	200	10.00	2	20	
32y	0.38	2.63	5.37	1000	200	10.00	2	20	
33y	0.30	3.33	4.67	1000	200	10.00	2	20	
34y	0.27	3.70	4.30	1000	200	10.00	2	20	
35y	0.49	2.04	5.96	1000	200	10.00	2	20	
36y	0.59	1.69	6.31	1000	200	10.00	2	20	
37y	0.38	2.63	5.37	1000	200	10.00	2	20	
38y	0.40	2.50	5.50	1000	200	10.00	2	20	
43y	0.316	3.16	4.84	1000	200	10.00	2	20	9
44y	0.523	1.91	6.09	1000	200	10.00	2	20	9
45y	0.247	4.05	3.95	1000	200	10.00	2	20	9

El cálculo del volumen final para la reacción en PCR fue realizado de la siguiente manera:

- Si se tiene una concentración de ARN de 0.51 μg/μl y se desea estimar en cuántos μl de H₂O libre de nucleasas se tiene 1 μg de ARN, se realiza un cálculo simple por regla de tres simple.

$$\begin{array}{rcl} 0.51 \mu\text{g} & \text{-----} & 1 \mu\text{l} \\ 1.00 \mu\text{g} & \text{-----} & x \mu\text{l} \end{array}$$

$$x = \frac{1.00 \mu\text{g} \times \mu\text{l}}{0.51 \mu\text{g}} = 1.96 \mu\text{l}$$

- ii. Para la síntesis del cDNA se requiere de un volumen final de reacción de 20 μl (18 μl de Master Mix + 2 μl de ARN) a fin de obtener el cDNA a una concentración de 1 $\mu\text{g}/20 \mu\text{l}$, es decir, 1000 ng/20 μl ó 50 ng/ μl .

$$1 \mu\text{g}/20 \mu\text{l} = 1000 \text{ ng}/20 \mu\text{l} = 50 \text{ ng}/\mu\text{l}$$

- iii. Se procede a realizar diluciones 1:5 a fin de obtener soluciones de trabajo de cDNA a una concentración de 10 ng/ μl . Por lo tanto, en 2 μl se tendrían 20 ng de cDNA.
- iv. Para el desarrollo de las RT-PCRs se requiere de cDNA a una concentración de 20 ng/ μl en un volumen final de reacción de 25 μl (23 μl de Master Mix + 2 μl de ADN).

Cuadro A.4. Valores promedio de Ct de cada gen diana, GAPDH, $2^{-\Delta\Delta Ct}$, desviación estándar¹, varianza² y coeficiente de variación³ en cada grupo etario.

Gen diana	Grupo etario	Ct gen diana	Ct GAPDH	$2^{-\Delta\Delta Ct}$	DS ¹	VAR ²	CV ³
STAT-1	Fetos	27.93	26.33	1.13	0.7501	0.5627	0.6627
	1-8 días ^a	23.33	21.78	1.58	1.3235	1.7517	0.8351
	10-21 días ^a	23.01	22.61	3.19	2.6855	7.2117	0.8429
	22-47 días ^a	22.45	22.48	5.99	5.4398	29.5909	0.9080
STAT-4	Fetos	29.92	26.33	1.13	0.7339	0.5386	0.6514
	1-8 días ^a	26.35	21.78	0.78	0.7463	0.5570	0.9563
	10-21 días ^a	25.92	22.61	1.84	2.1324	4.5471	1.1558
	22-47 días ^a	25.15	22.48	3.28	2.9414	8.6519	0.8972
T-bet	Fetos	35.48	26.33	1.01	0.2400	0.0576	0.2367
	1-8 días ^a	31.03	21.78	1.48	1.5234	2.3208	1.0325
	10-21 días ^b	29.81	22.61	4.76	3.1469	9.9029	0.6618
	22-47 días ^c	27.22	22.48	35.46	37.0949	1376.0334	1.0461
IL-12	Fetos	33.14	26.33	1.03	0.3771	0.1422	0.3644
	1-8 días ^a	31.58	21.78	0.16	0.1283	0.0165	0.8019
	10-21 días ^a	31.37	22.61	0.60	1.0290	1.0588	1.7273
	22-47 días ^a	31.01	22.48	0.45	0.4417	0.1951	0.9768
IL-2	Fetos	39.65	26.33	1.02	0.2631	0.0802	0.2776
	1-8 días ^a	34.56	21.78	2.70	2.6652	7.1036	0.9868
	10-21 días ^b	32.74	22.61	9.89	4.4217	19.5518	0.4471
	22-47 días ^b	31.65	22.48	26.52	15.6928	246.2653	0.5917
IFN- γ	Fetos	34.02	26.33	1.00	0.1005	0.0101	0.1002
	1-8 días ^a	30.51	21.78	2.24	4.5851	21.0227	2.0476
	10-21 días ^b	26.76	22.61	7.68	3.2482	12.2587	0.4230
	22-47 días ^b	24.43	22.48	117.18	134.5728	18109.8433	1.1484
TNF- α	Fetos	35.42	26.33	1.00	0.0418	0.0017	0.0418
	1-8 días ^a	31.49	21.78	0.90	0.8776	0.7701	0.9708
	10-21 días ^a	31.23	22.61	1.53	0.7226	0.5221	0.4707
	22-47 días ^b	29.52	22.48	5.39	3.7317	13.9258	0.6920

¹DS: desviación estándar, ²VAR: varianza, ³CV: coeficiente de variación, ^{a,b,c}grupos estadísticamente diferentes según análisis con Kruskal Wallis y Comparación Múltiple de Medianas.

Figura A.1. Temperatura de disociación de productos de RT-PCR amplificados con oligonucleótidos para GAPDH en mucosa intestinal de crías de alpaca. Se muestran cuatro curvas de melting de 86.24°C, 86.39°C, 86.41°C y 86.56°C.

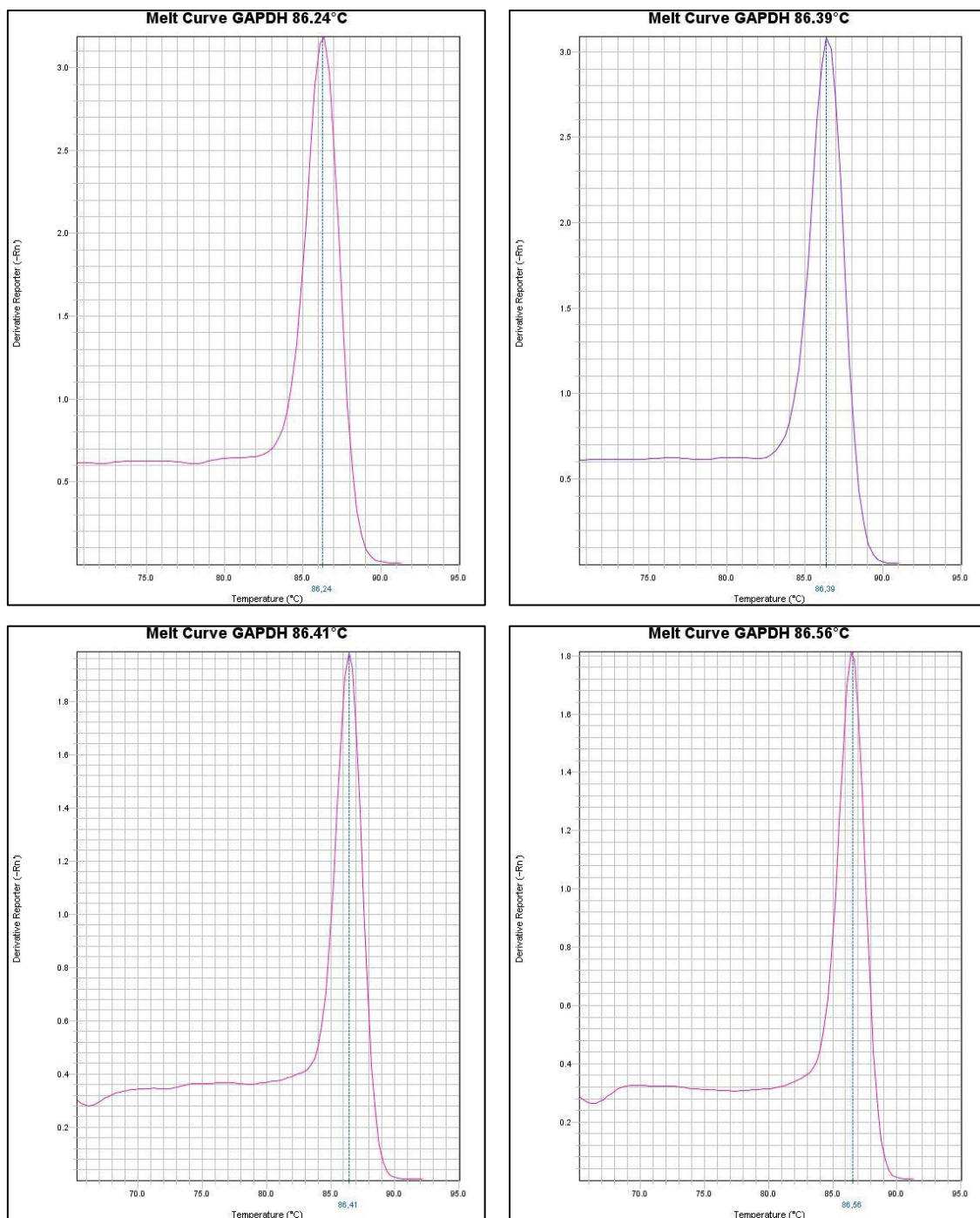


Figura A.2. Temperatura de disociación de productos de RT-PCR amplificados con oligonucleótidos para STAT-1 en mucosa intestinal de crías de alpaca. Se muestran cuatro curvas de melting de 76.13°C, 76.28°C, 76.43°C y 76.58°C.

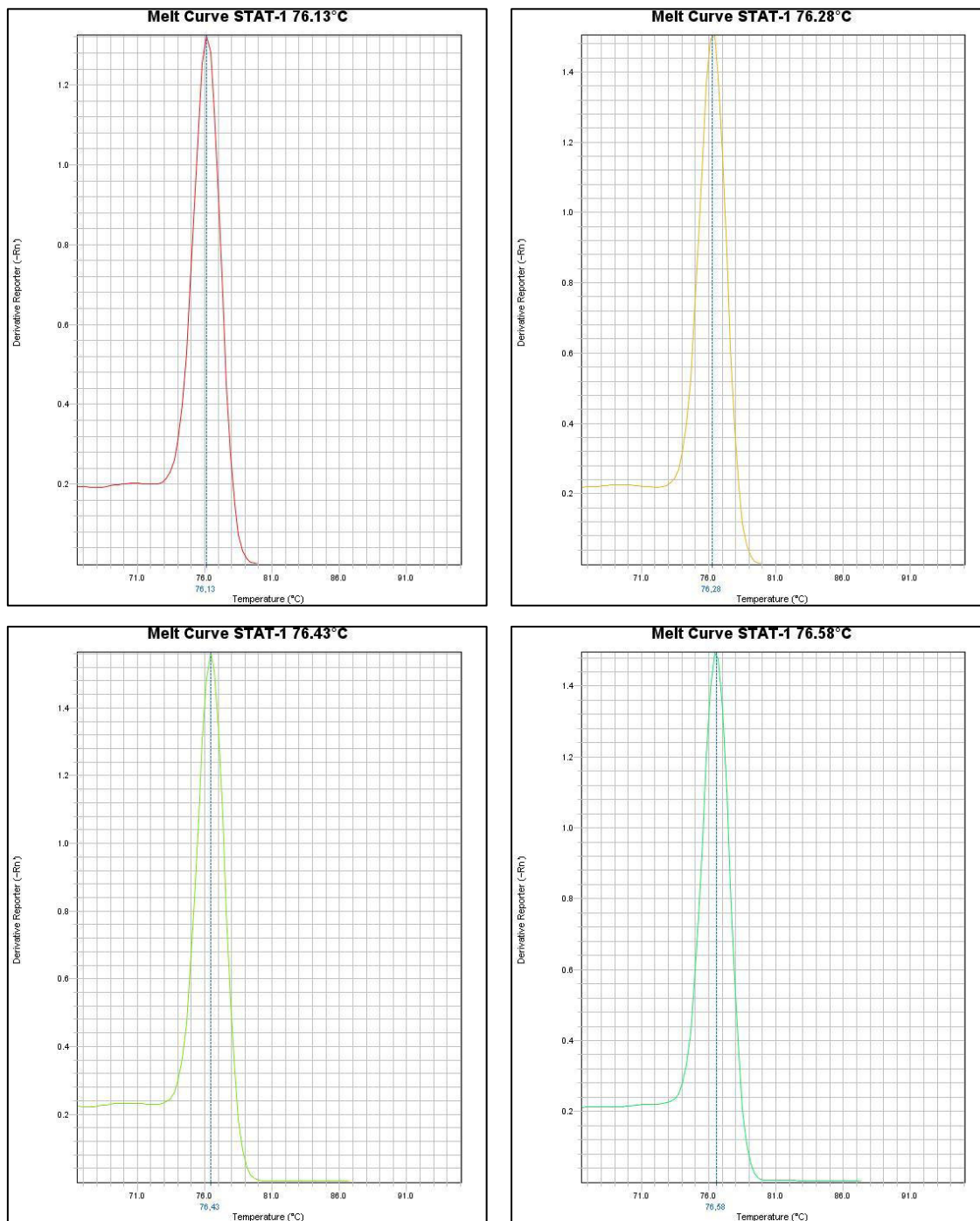


Figura A.3. Temperatura de disociación de productos de RT-PCR amplificados con oligonucleótidos para T-bet en mucosa intestinal de crías de alpaca. Se muestran cuatro curvas de melting de 80.35°C, 80.5°C, 80.65°C y 80.8°C.

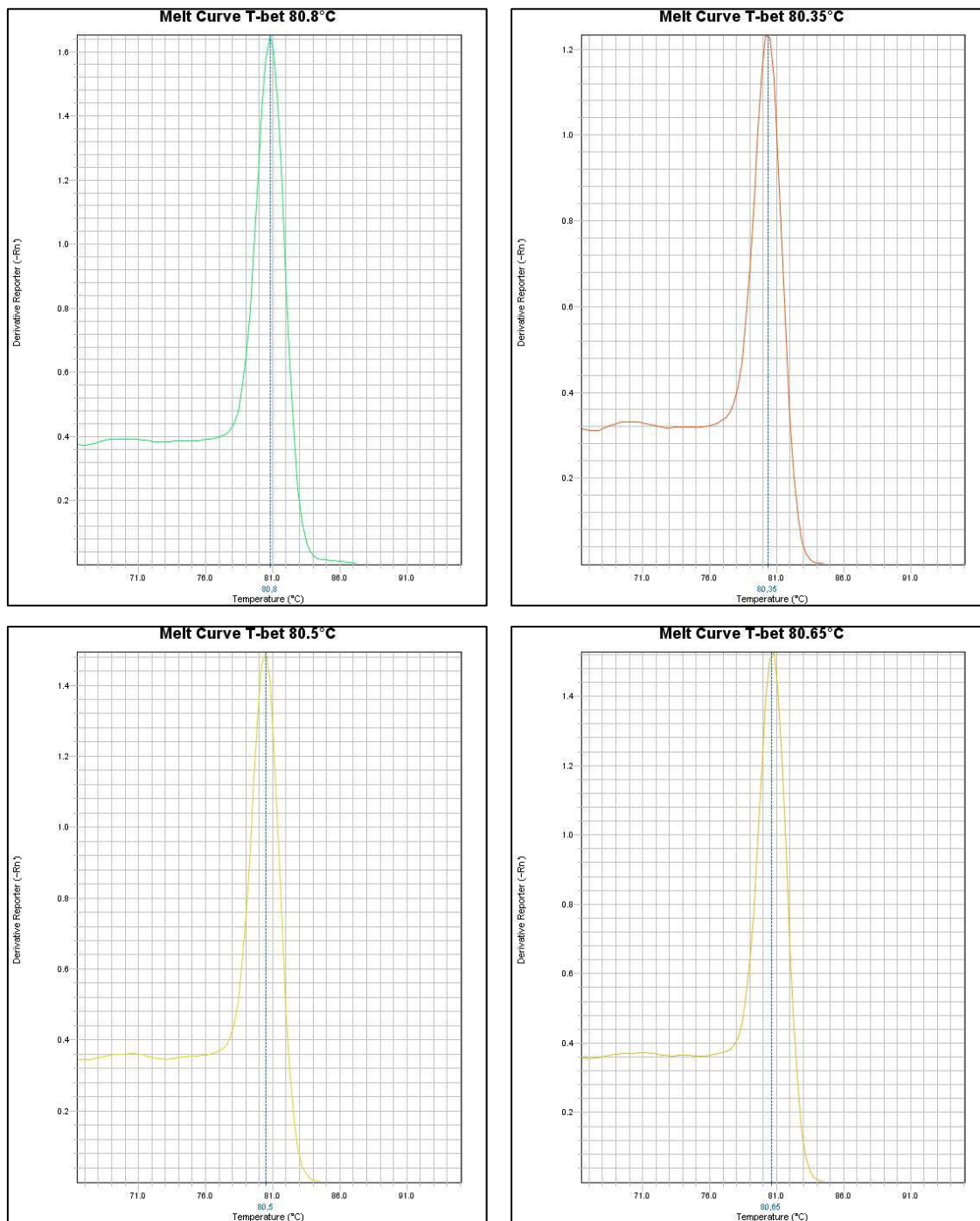


Figura A.4. Temperatura de disociación de productos de RT-PCR amplificados con oligonucleótidos para IFN- γ en mucosa intestinal de crías de alpaca. Se muestran cuatro curvas de melting de 76.78°C, 76.93°C, 77.08°C, 77.23°C.

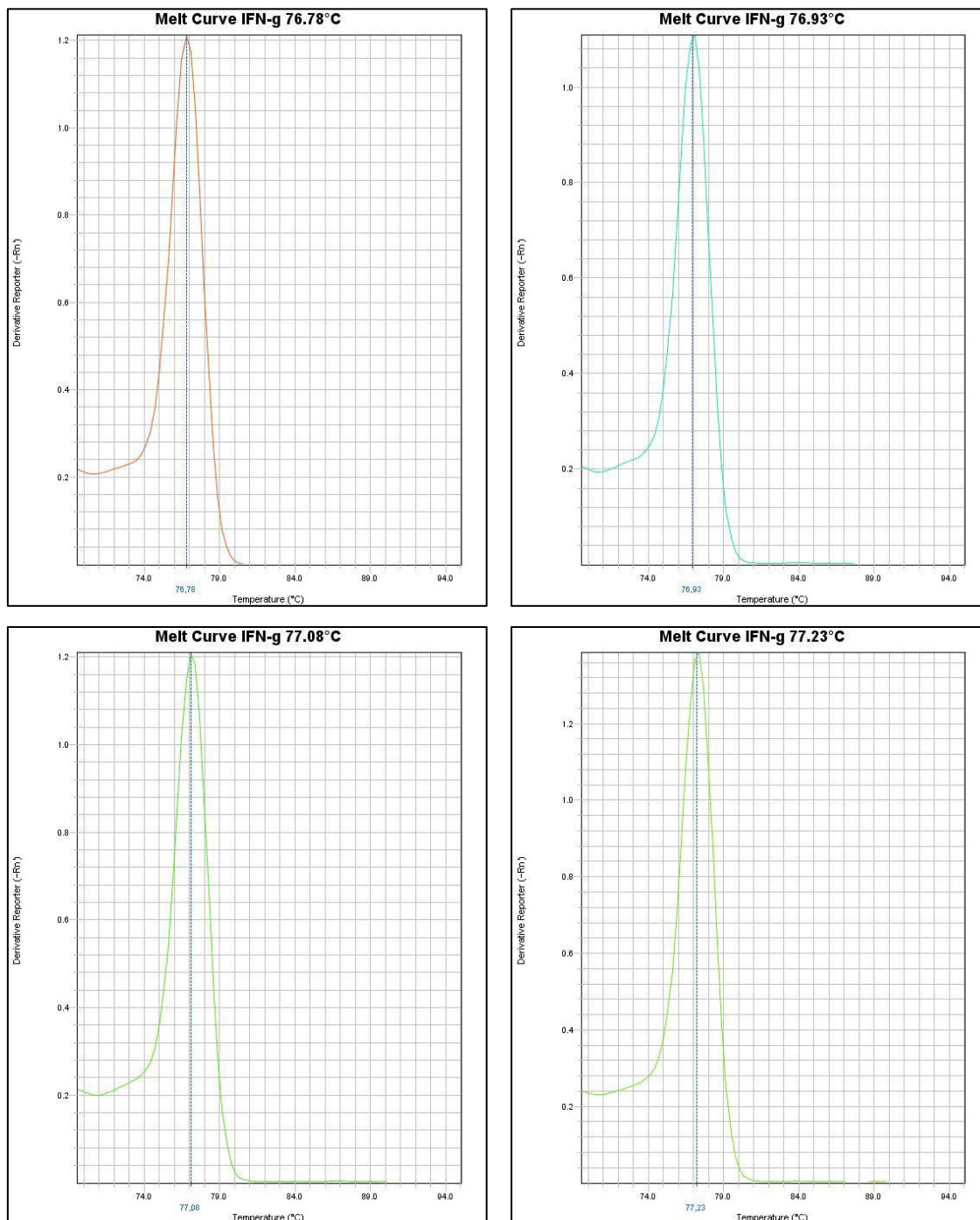


Figura A.5. Temperatura de disociación de productos de RT-PCR amplificados con oligonucleótidos para STAT-4 en mucosa intestinal de crías de alpaca. Se muestran seis curvas de melting de 77.6°C, 77.75°C, 77.77°C, 77.9°C, 77.92°C y 78.07°C.

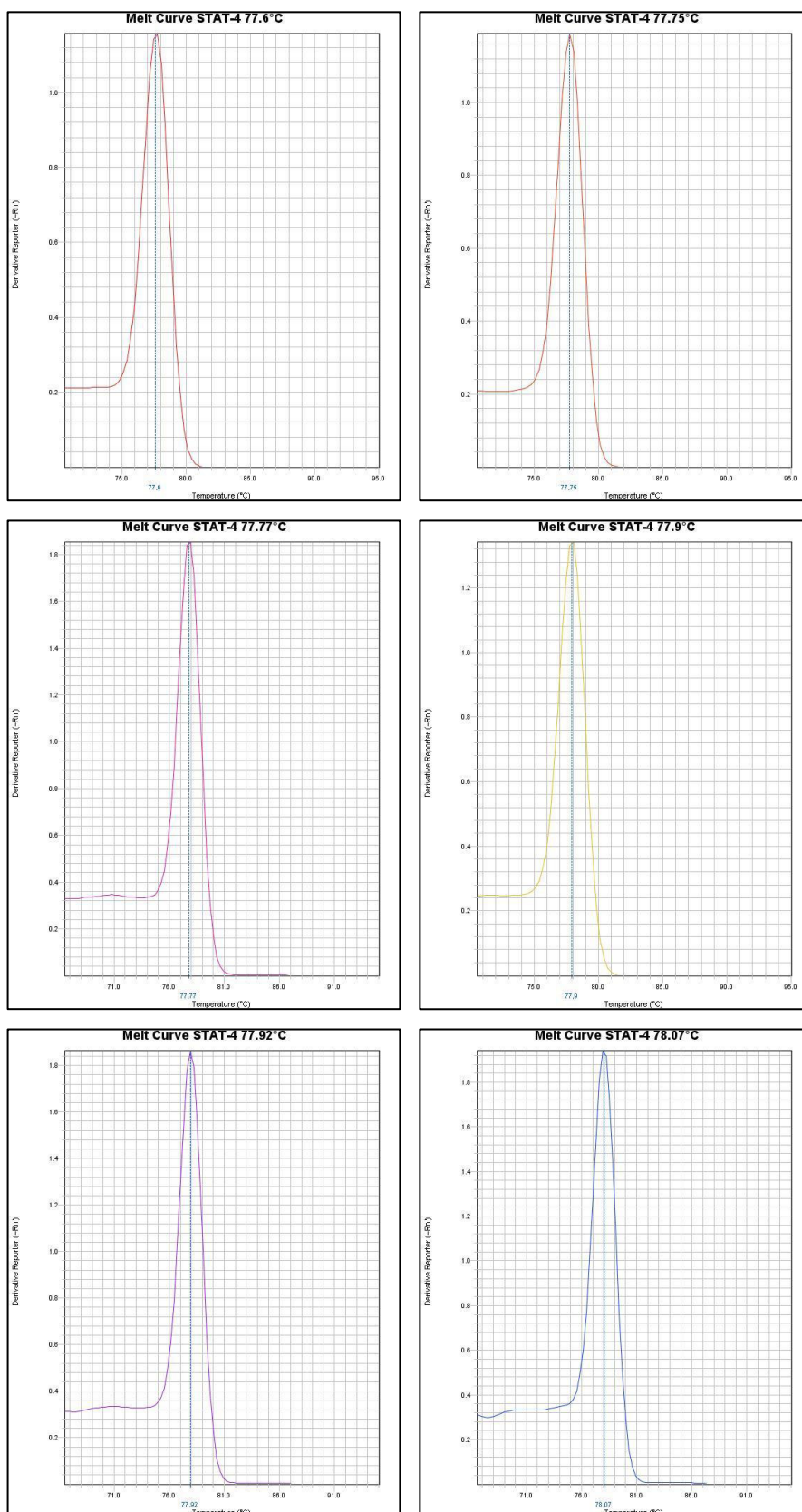


Figura A.6. Temperatura de disociación de productos de RT-PCR amplificados con oligonucleótidos para IL-12 en mucosa intestinal de crías de alpaca. Se muestran cuatro curvas de melting de 81.62°C, 81.91°C, 82.06°C y 82.21°C.

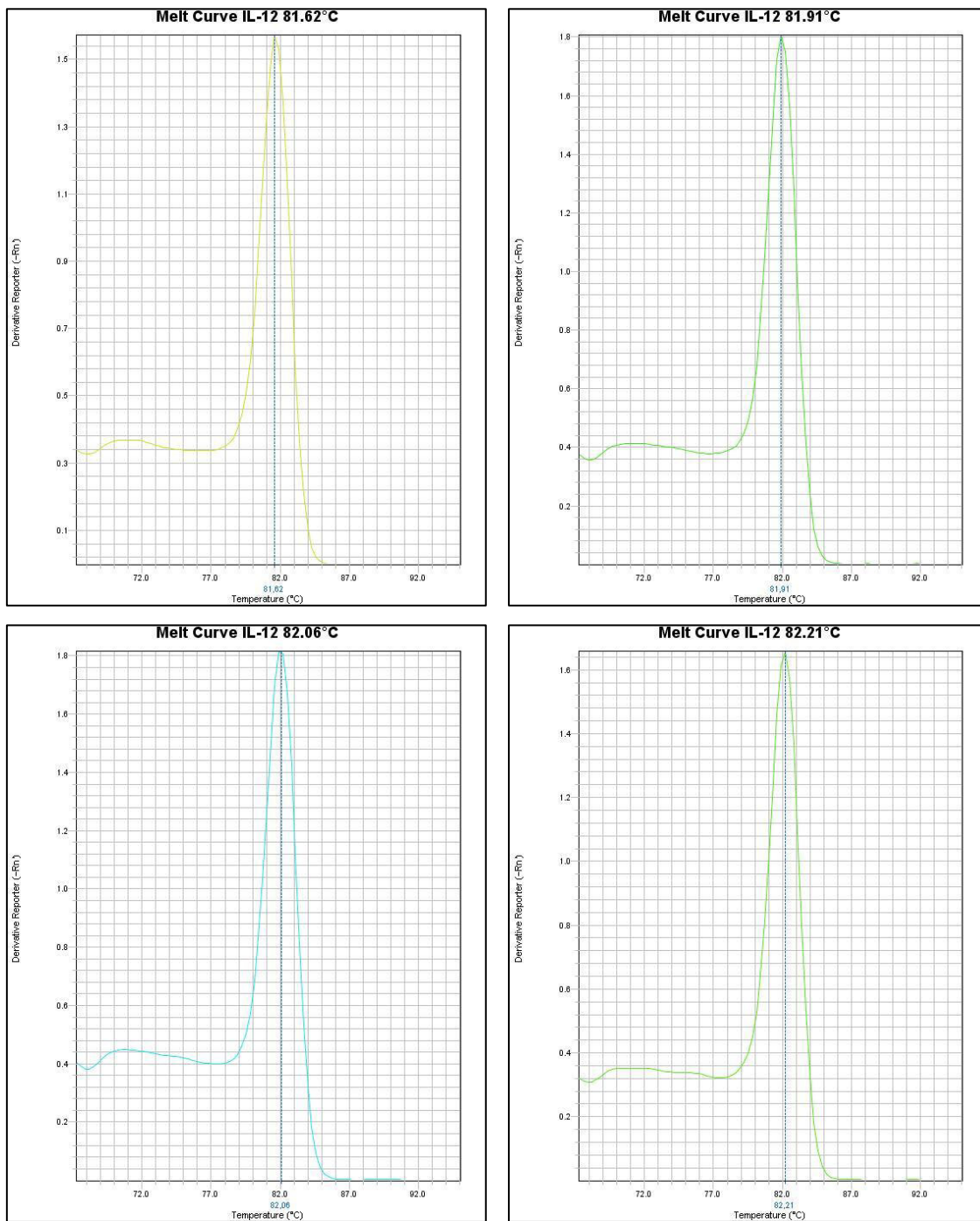


Figura A.7. Temperatura de disociación de productos de RT-PCR amplificados con oligonucleótidos para IL-2 en mucosa intestinal de crías de alpaca. Se muestran cinco curvas de melting de 77.71°C, 77.86°C, 78.01°C, 78.16°C y 78.31°C.

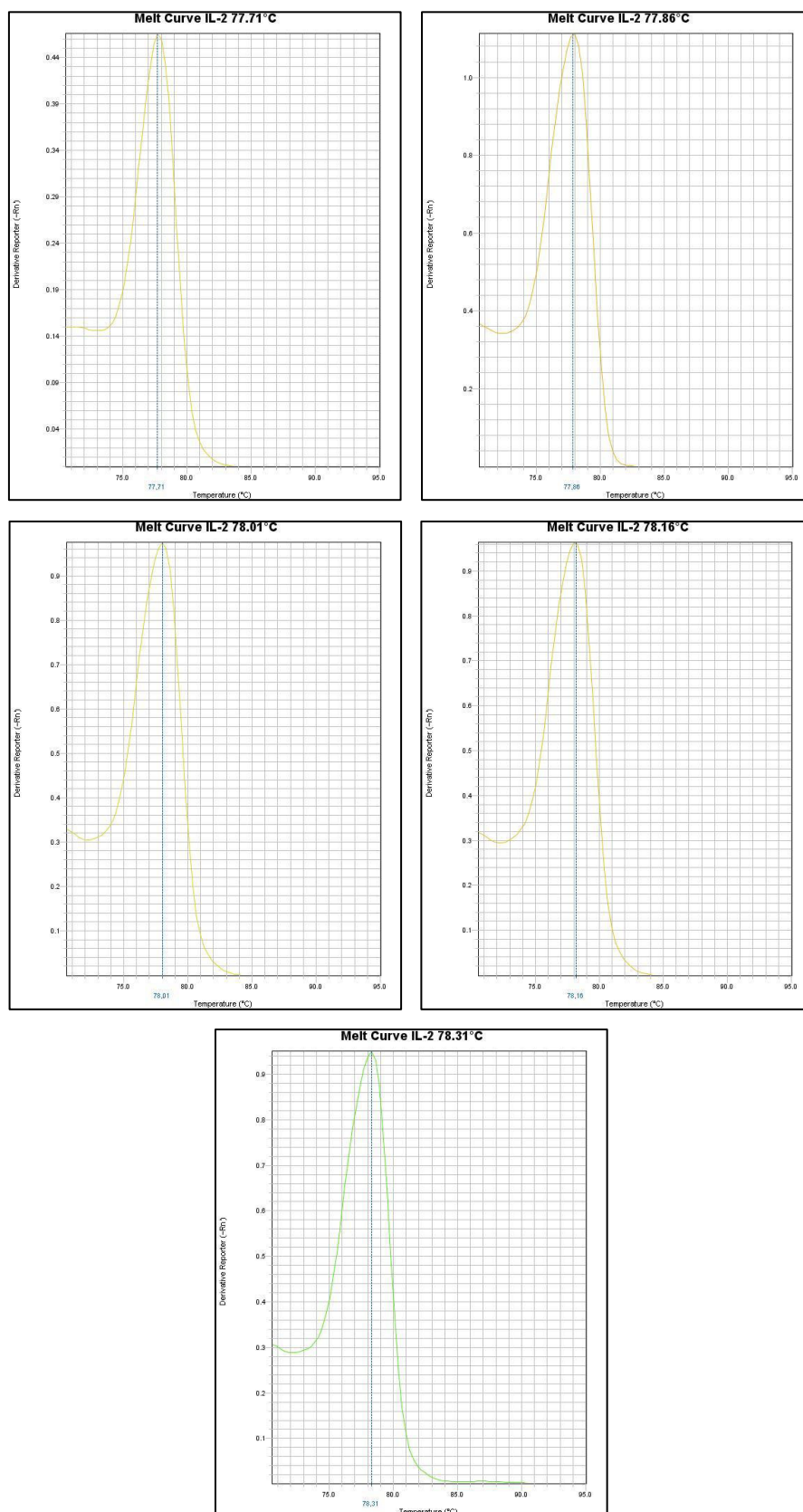


Figura A.8. Temperatura de disociación de productos de RT-PCR amplificados con oligonucleótidos para TNF- α en mucosa intestinal de crías de alpaca. Se muestran cinco curvas de melting de 83.75°C, 83.97°C, 84.04°C, 84.12°C y 84.19°C.

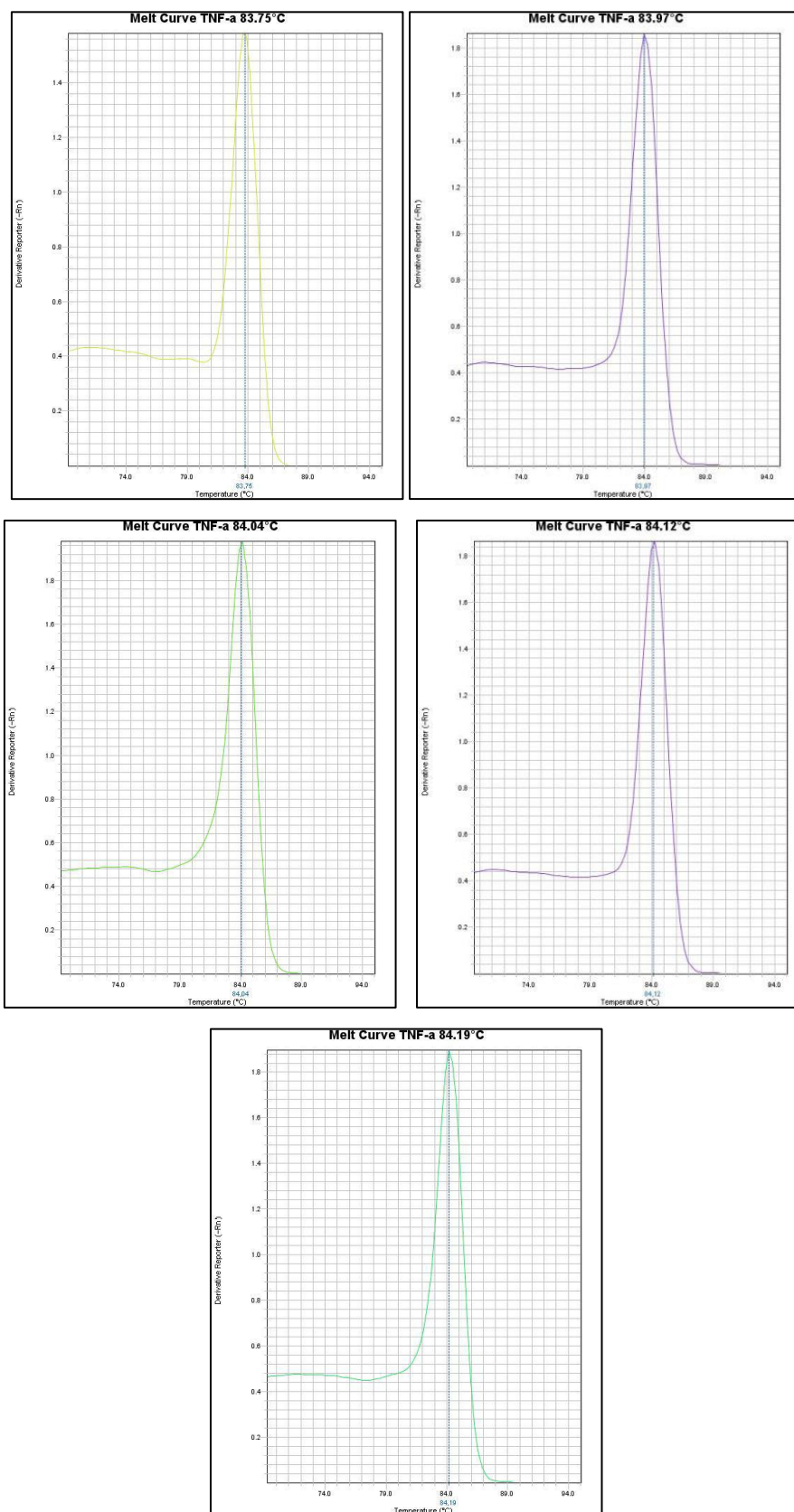


Figura A.9. Análisis estadístico (no paramétrico y paramétrico) de STAT-1

Shapiro-Wilk W test for normal data

Variable	Obs	W	V	z	Prob>z
deltastat1	20	0.76351	5.598	3.471	0.00026

Kruskal-Wallis equality-of-populations rank test

+-----+			
grupo	Obs	Rank Sum	
+-----+			
0	1	8.00	
1	7	52.00	
2	6	70.00	
3	6	80.00	
+-----+			

chi-squared = 3.675 with 3 d.f.
probability = 0.2988

chi-squared with ties = 3.678 with 3 d.f.
probability = 0.2984

Source	Analysis of Variance			F	Prob > F
	SS	df	MS		
Between groups	68.7824726	3	22.9274909	1.89	0.1727
Within groups	194.530598	16	12.1581624		
Total	263.313071	19	13.8585827		

Bartlett's test for equal variances: chi2(2) = 9.0181 Prob>chi2 = 0.011

note: Bartlett's test performed on cells with positive variance:
1 single-observation cells not used

Comparison of Delta STAT-1 by Grupo
(Bonferroni)

Row Mean-			
Col Mean	0	1	2
+-----+			
1	.454286		
	1.000		
2	2.055	1.60071	
	1.000	1.000	
3	4.86167	4.40738	2.80667
	1.000	0.223	1.000

Figura A.10. Análisis estadístico (no paramétrico y paramétrico) de T-bet

```

Shapiro-Wilk W test for normal data

Variable | Obs      W      V      z      Prob>z
-----+-----
deltatbet | 20    0.53718  10.955  4.824  0.00000

Kruskal-Wallis equality-of-populations rank test

+-----+
| grupo | Obs | Rank Sum |
+-----+
| 0 | 1 | 6.00 |
| 1 | 7 | 35.00 |
| 2 | 6 | 66.00 |
| 3 | 6 | 103.00 |
+-----+

chi-squared = 14.290 with 3 d.f.
probability = 0.0025

chi-squared with ties = 14.290 with 3 d.f.
probability = 0.0025

One-way analysis of variance by ranks (Kruskal-Wallis Test)

grupo    Obs    RankSum    RankMean
-----
1         7      33.00      4.71
2         6      60.00     10.00
3         6      97.00     16.17

Chi-squared (uncorrected for ties) = 13.381 with 2 d.f. (p = 0.00124)
Chi-squared (corrected for ties) = 13.381 with 2 d.f. (p = 0.00124)

Multiple comparisons between groups
-----
(Adjusted p-value for significance is 0.008333)

Ho: deltatbet(grupo==1) = deltatbet(grupo==2)
RankMeans difference = 5.29 Critical value = 7.49
Prob = 0.045675 (NS) [Grupo 1 vs Grupo 2]

Ho: deltatbet(grupo==1) = deltatbet(grupo==3)
RankMeans difference = 11.45 Critical value = 7.49
Prob = 0.000127 (S) [Grupo 1 vs Grupo 3]

Ho: deltatbet(grupo==2) = deltatbet(grupo==3)
RankMeans difference = 6.17 Critical value = 7.78
Prob = 0.028844 (NS) [Grupo 2 vs Grupo 3]

Analysis of Variance
Source      SS      df      MS      F      Prob > F
-----
Between groups  4504.30352    3    1501.43451    3.46    0.0414
Within groups  6944.28934   16    434.018083
-----
Total        11448.5929   19    602.557519

Bartlett's test for equal variances:  chi2(2) = 41.0690  Prob>chi2 = 0.000

note: Bartlett's test performed on cells with positive variance:

```

```

1 single-observation cells not used

Comparison of Delta T-bet by Grupo
(Bonferroni)
Row Mean-|
Col Mean |      0      1      2
-----+-----
1 |      .467143
  |      1.000
2 |      3.74833      3.28119
  |      1.000      1.000
3 |      34.4483      33.9812      30.7
  |      0.872      0.059      0.128

```

Figura A.11. Análisis estadístico (no paramétrico y paramétrico) de IFN- γ

```

Shapiro-Wilk W test for normal data

Variable |      Obs      W      V      z      Prob>z
-----+-----
deltaifng |      19      0.50788      11.235      4.859      0.00000

```

Kruskal-Wallis equality-of-populations rank test

```

+-----+
| grupo | Obs | Rank Sum |
+-----+-----+
|      0 |   1 |      6.00 |
|      1 |   7 |     35.00 |
|      2 |   5 |     53.00 |
|      3 |   6 |     96.00 |
+-----+

chi-squared =      12.909 with 3 d.f.
probability =      0.0048

chi-squared with ties =      12.909 with 3 d.f.
probability =      0.0048

```

One-way analysis of variance by ranks (Kruskal-Wallis Test)

```

grupo      Obs      RankSum      RankMean
-----+-----
0          1          6.00          6.00
1          7         35.00          5.00
2          5         53.00         10.60
3          6         96.00         16.00

Chi-squared (uncorrected for ties) =      12.909 with      3 d.f. (p = 0.00484)
Chi-squared (corrected for ties)   =      12.909 with      3 d.f. (p = 0.00484)

Multiple comparisons between groups
-----
(Adjusted p-value for significance is 0.004167)

Ho: deltaifng(grupo==1) = deltaifng(grupo==2)
RankMeans difference =      1.00      Critical value =      15.87
Prob = 0.433989 (NS)

```

Ho: deltaifng(grupo==1) = deltaifng(grupo==3)
RankMeans difference = 4.60 Critical value = 16.26
Prob = 0.227768 (NS)

Ho: deltaifng(grupo==1) = deltaifng(grupo==4)
RankMeans difference = 10.00 Critical value = 16.04
Prob = 0.049962 (NS) [Calibrador vs Grupo 3] NO SE TOMA EN CUENTA

Ho: deltaifng(grupo==2) = deltaifng(grupo==3)
RankMeans difference = 5.60 Critical value = 8.69
Prob = 0.044609 (NS) [Grupo 1 vs Grupo 2]

Ho: deltaifng(grupo==2) = deltaifng(grupo==4)
RankMeans difference = 11.00 Critical value = 8.26
Prob = 0.000221 (S) [Grupo 1 vs grupo 3]

Ho: deltaifng(grupo==3) = deltaifng(grupo==4)
RankMeans difference = 5.40 Critical value = 8.99
Prob = 0.056513 (NS) [Grupo 2 vs grupo 3] NO SIGNIFICATIVO

Source	Analysis of Variance			F	Prob > F
	SS	df	MS		
Between groups	52466.3726	3	17488.7909	2.89	0.0701
Within groups	90727.5678	15	6048.50452		
Total	143193.94	18	7955.21891		

Bartlett's test for equal variances: $\chi^2(2) = 48.8189$ Prob> $\chi^2 = 0.000$

note: Bartlett's test performed on cells with positive variance:
1 single-observation cells not used

Comparison of Delta IFN-g by Grupo (Bonferroni)				
Row Mean-	0	1	2	
Col Mean				
1	1.23857			
	1.000			
2	6.678	5.43943		
	1.000	1.000		
3	116.18	114.941	109.502	
	1.000	0.108	0.207	

Figura A.12. Análisis estadístico (no paramétrico y paramétrico) de STAT-4

Shapiro-Wilk W test for normal data

Variable	Obs	W	V	z	Prob>z
deltastat4	20	0.73450	6.284	3.704	0.00011

Kruskal-Wallis equality-of-populations rank test

+-----+			
grupo	Obs	Rank Sum	
+-----+			
0	1	11.00	
1	7	51.00	
2	6	69.00	
3	6	79.00	
+-----+			

chi-squared = 3.464 with 3 d.f.
probability = 0.3255

chi-squared with ties = 3.464 with 3 d.f.
probability = 0.3255

Source	Analysis of Variance			F	Prob > F
	SS	df	MS		
Between groups	20.7682212	3	6.92274041	1.60	0.2295
Within groups	69.3836316	16	4.33647697		
Total	90.1518528	19	4.74483436		

Bartlett's test for equal variances: chi2(2) = 7.9578 Prob>chi2 = 0.019

note: Bartlett's test performed on cells with positive variance:
1 single-observation cells not used

Comparison of Delta STAT-4 by Grupo
(Bonferroni)

Row Mean-			
Col Mean	0	1	2
+-----+			
1	-.35		
	1.000		
2	.715	1.065	
	1.000	1.000	
3	2.14833	2.49833	1.43333
	1.000	0.280	1.000

Figura A.13. Análisis estadístico (no paramétrico y paramétrico) de IL-12

```

Shapiro-Wilk W test for normal data

Variable | Obs      W      V      z      Prob>z
-----+-----
deltail12b | 20    0.59246    9.647    4.568    0.00000

Kruskal-Wallis equality-of-populations rank test

+-----+
| grupo | Obs | Rank Sum |
+-----+
| 0 | 1 | 18.00 |
| 1 | 7 | 49.00 |
| 2 | 6 | 65.50 |
| 3 | 6 | 77.50 |
+-----+

chi-squared =      5.088 with 3 d.f.
probability =      0.1655

chi-squared with ties =      5.103 with 3 d.f.
probability =      0.1644

Analysis of Variance
Source      SS      df      MS      F      Prob > F
-----
Between groups  1.03040593    3    .343468645    0.86    0.4802
Within groups  6.36436931   16    .397773082
-----
Total          7.39477524   19    .389198697

Bartlett's test for equal variances:  chi2(2) = 16.3425  Prob>chi2 = 0.000

note: Bartlett's test performed on cells with positive variance:
      1 single-observation cells not used

Comparison of Delta IL-12b by Grupo
(Bonferroni)
Row Mean-|
Col Mean |      0      1      2
-----
1 |      -.868571
   |      1.000
2 |      -.435      .433571
   |      1.000      1.000
3 |      -.576667      .291905      -.141667
   |      1.000      1.000      1.000

```

Figura A.14. Análisis estadístico (no paramétrico y paramétrico) de IL-2

```

Shapiro-Wilk W test for normal data

Variable | Obs      W      V      z      Prob>z
-----+-----
deltail2 |    19    0.78718  4.858  3.175  0.00075

Kruskal-Wallis equality-of-populations rank test

+-----+
| grupo | Obs | Rank Sum |
+-----+-----+
|    0  |  1  |    3.00  |
|    1  |  6  |   30.00  |
|    2  |  6  |   68.00  |
|    3  |  6  |   89.00  |
+-----+

chi-squared =    11.047 with 3 d.f.
probability =     0.0115

chi-squared with ties =    11.047 with 3 d.f.
probability =     0.0115

One-way analysis of variance by ranks (Kruskal-Wallis Test)

grupo      Obs      RankSum      RankMean
-----
0          1         3.00         3.00
1          6        30.00         5.00
2          6        68.00        11.33
3          6        89.00        14.83

Chi-squared (uncorrected for ties) =    11.047 with    3 d.f. (p = 0.01147)
Chi-squared (corrected for ties)   =    11.047 with    3 d.f. (p = 0.01147)

Multiple comparisons between groups
-----
(Adjusted p-value for significance is 0.004167)

Ho: deltail2(grupo==1) = deltail2(grupo==2)
RankMeans difference =      2.00 Critical value =    16.04
Prob = 0.371061 (NS)

Ho: deltail2(grupo==1) = deltail2(grupo==3)
RankMeans difference =      8.33 Critical value =    16.04
Prob = 0.085184 (NS)

Ho: deltail2(grupo==1) = deltail2(grupo==4)
RankMeans difference =     11.83 Critical value =    16.04
Prob = 0.025776 (NS) [Calibrador vs Grupo 3]

Ho: deltail2(grupo==2) = deltail2(grupo==3)
RankMeans difference =      6.33 Critical value =      8.57
Prob = 0.025626 (NS) [Grupo 1 vs Grupo 2]

Ho: deltail2(grupo==2) = deltail2(grupo==4)
RankMeans difference =      9.83 Critical value =      8.57
Prob = 0.001236 (S)  [Grupo 1 vs Grupo 3]

Ho: deltail2(grupo==3) = deltail2(grupo==4)
RankMeans difference =      3.50 Critical value =      8.57
Prob = 0.140678 (NS)

```

Source	SS	df	MS	F	Prob > F
Between groups	1928.17945	3	642.726483	7.06	0.0035
Within groups	1364.74346	15	90.9828972		
Total	3292.92291	18	182.940161		

Bartlett's test for equal variances: $\chi^2(2) = 14.1944$ Prob> $\chi^2 = 0.001$

note: Bartlett's test performed on cells with positive variance:
1 single-observation cells not used

Comparison of Delta IL-2 by Grupo (Bonferroni)			
Row Mean-	0	1	2
1	1.68167		
	1.000		
2	8.87	7.18833	
	1.000	1.000	
3	25.5017	23.82	16.6317
	0.154	0.004	0.052

Figura A.15. Análisis estadístico (no paramétrico y paramétrico) de TNF- α

Shapiro-Wilk W test for normal data					
Variable	Obs	W	V	z	Prob>z
deltatnf	20	0.69455	7.230	3.987	0.00003

Kruskal-Wallis equality-of-populations rank test

grupo	Obs	Rank Sum
0	1	7.00
1	7	42.00
2	6	62.00
3	6	99.00

chi-squared = 10.576 with 3 d.f.
probability = 0.0143

chi-squared with ties = 10.576 with 3 d.f.
probability = 0.0143

One-way analysis of variance by ranks (Kruskal-Wallis Test)

grupo	Obs	RankSum	RankMean
0	1	7.00	7.00
1	7	42.00	6.00
2	6	62.00	10.33
3	6	99.00	16.50

Chi-squared (uncorrected for ties) = 10.576 with 3 d.f. (p = 0.01425)
 Chi-squared (corrected for ties) = 10.576 with 3 d.f. (p = 0.01425)

Multiple comparisons between groups

(Adjusted p-value for significance is 0.004167)

Ho: deltatnfa(grupo==1) = deltatnfa(grupo==2)
 RankMeans difference = 1.00 Critical value = 16.69
 Prob = 0.437184 (NS)

Ho: deltatnfa(grupo==1) = deltatnfa(grupo==3)
 RankMeans difference = 3.33 Critical value = 16.86
 Prob = 0.300960 (NS)

Ho: deltatnfa(grupo==1) = deltatnfa(grupo==4)
 RankMeans difference = 9.50 Critical value = 16.86
 Prob = 0.068550 (NS)

Ho: deltatnfa(grupo==2) = deltatnfa(grupo==3)
 RankMeans difference = 4.33 Critical value = 8.68
 Prob = 0.093993 (NS)

Ho: deltatnfa(grupo==2) = deltatnfa(grupo==4)
 RankMeans difference = 10.50 Critical value = 8.68
 Prob = 0.000711 (S) [Grupo 1 vs Grupo 3] calibrador vs grupo 2

Ho: deltatnfa(grupo==3) = deltatnfa(grupo==4)
 RankMeans difference = 6.17 Critical value = 9.01
 Prob = 0.035505 (NS) [Grupo 2 vs Grupo 3] grupo 1 vs grupo 2

Source	Analysis of Variance			F	Prob > F
	SS	df	MS		
Between groups	75.8474577	3	25.2824859	5.26	0.0102
Within groups	76.8466385	16	4.8029149		
Total	152.694096	19	8.03653138		

Bartlett's test for equal variances: chi2(2) = 15.4509 Prob>chi2 = 0.000

note: Bartlett's test performed on cells with positive variance:
 1 single-observation cells not used

Comparison of Delta TNF-a by Grupo (Bonferroni)				
Row Mean-				
Col Mean	0	1	2	
1	-.095714			
	1.000			
2	.533333	.629048		
	1.000	1.000		
3	4.39333	4.48905	3.86	
	0.492	0.012	0.046	